

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



IMPLICACIÓN DEL RECEPTOR AhR EN NEUROPROTECCIÓN Y
NEURORREPARACIÓN EN ICTUS ISQUÉMICO EXPERIMENTAL

TESIS DOCTORAL DE:

MARÍA ISABEL CUARTERO DESVIAT

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

**MARÍA ÁNGELES MORO SÁNCHEZ
IGNACIO LIZASOAIN HERNÁNDEZ
ÁNGEL CORBÍ LÓPEZ**

Madrid, 2013

©María Isabel Cuartero Desviat, 2013

Universidad Complutense de Madrid



Facultad de Medicina
Departamento de Farmacología

Implicación del receptor AhR en neuroprotección y neuroreparación en ictus isquémico experimental

Tesis doctoral
María Isabel Cuartero Desviat

Directores de tesis
María Ángeles Moro Sánchez
Ignacio Lizasoain Hernández
Ángel Corbí López

Madrid, 2013

AGRADECIMIENTOS

A mi familia,

Por su apoyo incondicional

A Enzo,

Por hacerme sonreír cuando nadie

más consigue hacerlo

Dentro de nosotros existe algo que no tiene nombre

y eso es lo que realmente somos

José Saramago

Tras nadar durante mucho tiempo en océanos imaginarios, me sumergí de lleno entre probetas, matraces y vasos de precipitados. Pilas de artículos con proteínas impronunciables, cascadas interminables y rutas inexploradas que hoy forman parte de mí día a día. Poco a poco he ido creciendo, madurando, empezando a comprender. El camino hasta ahora no ha sido fácil, y aún queda mucho por recorrer. De vez en cuando sigo refugiándome entre las olas, pero siempre estáis ahí. A veces como sombras, sabéis que lo necesito, yo soy así. Me aílo y desaparezco. Pero también sabéis que sin vosotros iría a la deriva. Con vosotros aún existe el todavía. Como dijo Pablo Neruda “mi vida está hecha de todas las vidas”, de vuestras vidas. Gracias a vosotros, mi familia y mis amigos. Y gracias a mis jefes, mis compañeros y a todas aquellas personas que de alguna u otra forma han contribuido a esta Tesis doctoral.

Es interminable la lista de personas a las que agradecer su colaboración en este trabajo. Cada una, de manera distinta, ha contribuido a que finalmente hoy llegue hasta aquí. He de reconocer que dar las gracias no es tarea fácil. Requiere de esa memoria que dada su fragilidad puede ser traicionera, espero que aquellos a los que no cito no lo interpreten como desapego.

Mi más sincero agradecimiento a María Ángeles y Nacho. No solo por haberme permitido formarme, por haberme guiado y aconsejado, por hacerme crecer como científica en potencia y por hacerme ver la ciencia desde una nueva perspectiva, sino también, por permitirme volver a creer. Tras la oscuridad, siempre hay luz. Gracias a ambos por confiar en mí. Gracias a ambos por vuestra vitalidad, energía y fortaleza que os permiten estar siempre ahí. Sois en mi opinión un ejemplo a seguir.

Me gustaría dar las gracias a María Ángeles y Ángel Corbí por haberme hecho partícipe de esas reuniones tan intensas en donde da gusto hablar de ciencia. De estas reuniones he aprendido que la ciencia, sin pasión, carece de sentido.

También agradezco al equipo de la Dra. Torres y el Dr. Sánchez-Prieto de la Facultad de Veterinaria de la UCM, la ayuda prestada en alguno de los experimentos mostrados en esta Tesis Doctoral. En especial a Mayka, David y Salvatore que estuvieron con nosotros en todo momento.

Me gustaría dar las gracias al Dr. Fernández-Salguero de la Universidad de Extremadura por su colaboración y consejos en este proyecto, así como por habernos cedido ratones para la generación de la colonia de animales nulos para AhR.

También me gustaría agradecer al Dr. Harkin su disposición, colaboración y ayuda en relación los experimentos realizados con las kinureninas.

Con mis chicos de la UIN este camino ha sido mucho más llevadero. Todos sois grandes compañeros y muchos de vosotros también grandes amigos. Oli, Lupe, Mayka, Maki, Pilar, Iván, Isaass, Víctor, La Moragui, Tamari, Roberti, Martita, Ali, Sara, a mis chicos del “Equipo A” Juanete y Alberto y también, a Jesús y el Dr. Sarruk con seta. Muchas gracias por vuestro apoyo y consejo. Muchas por estar ahí siempre que os he necesitado y por haberme aguantado en esta última temporada...se que ha sido una tarea difícil.

En especial, quiero dar las gracias a Ana y a Maki por vuestra complicidad en los buenos y malos momentos. Chicas, habéis tenido la tarea nada fácil de evitar

que me derrumbe ante los contratiempos. Gracias por escucharme y por estar ahí. Gracias por respetar mi silencio. Sois grandes amigas.

Pero sin duda, me gustaría dar las gracias a Iván, mi compañero, mi pareja científica y sobre todo mi amigo. Sin ti esta Tesis no hubiese sido posible. Muchas gracias por levantarme cuando estoy abajo y por auparme cuando estoy arriba. Por intentar ver el mundo a través de mis ojos y por dejarme ver el mundo a través de los tuyos. Porque contigo he aprendido a crear arte de la ciencia. Y ya sabes, porque contigo puedo ser quien realmente soy.

También me gustaría dar las gracias al resto de compañeros de este departamento, a los técnicos, personal del animalario, personal de limpieza y de la cafetería y a todos los que comparten este día a día conmigo.

En lo personal, agradezco a mi familia y amigas su paciencia y comprensión día a día. Me habéis escuchado hablar de lo mismo hasta el hastío. Pero además, habéis sabido cuando callar y habéis respetado mis ausencias y silencios. Espero ser capaz algún día de agradecerlos todo esto.

A mis mejores amigas Sus, a Cris y a Isa. Toda una vida juntas. Unas niñas con esperanzas, miedos y sueños que finalmente se han transformado en lo que somos ahora, con nuevos sueños, ilusiones y miedos, pero espero que como hasta ahora, con nuestros más y nuestros menos, recorramos este camino juntas.

De mis padres he aprendido que la vida es para los valientes. Sois dignos ejemplos de superación y entrega. Me habéis enseñado a crear a partir de la nada y a pensar que todo es posible. Mamá, has sido y eres mi pilar. Mi gran

aliada y mi mejor amiga. Un ejemplo insuperable de fuerza y voluntad. Papá, me has enseñado que con esfuerzo y constancia somos capaces de cualquier cosa, que siempre es posible empezar otra vez de cero, resurgir de la nada. A mis hermanas, Tamy y Bea, dos mujeres increíbles que siempre están ahí para lo que sea. Demostrad al mundo lo que valéis. A Manuel, por mostrarme su pequeño universo y hacerme recordar. A mis tíos, Pepi y Javi, por creer en mí y quererme tanto. A mis abuelos, a los que están, pero también, a los que se marcharon. Si no pasa nada, ya podríais llamarme doctora. A Enzo, mi pequeño, mi fiel e inagotable amigo, por lo que hemos pasado juntos y por todo lo que nos queda por pasar.

La vida está hecha de pequeños instantes que se hacen grandes en nuestra memoria y perduran para siempre. Sé que esta Tesis será uno de esos momentos, y por ello solo he dicho a los que están, a los que estuvieron y a los que les gustaría haber estado pero la vida no les ha dejado,

Muchísimas gracias

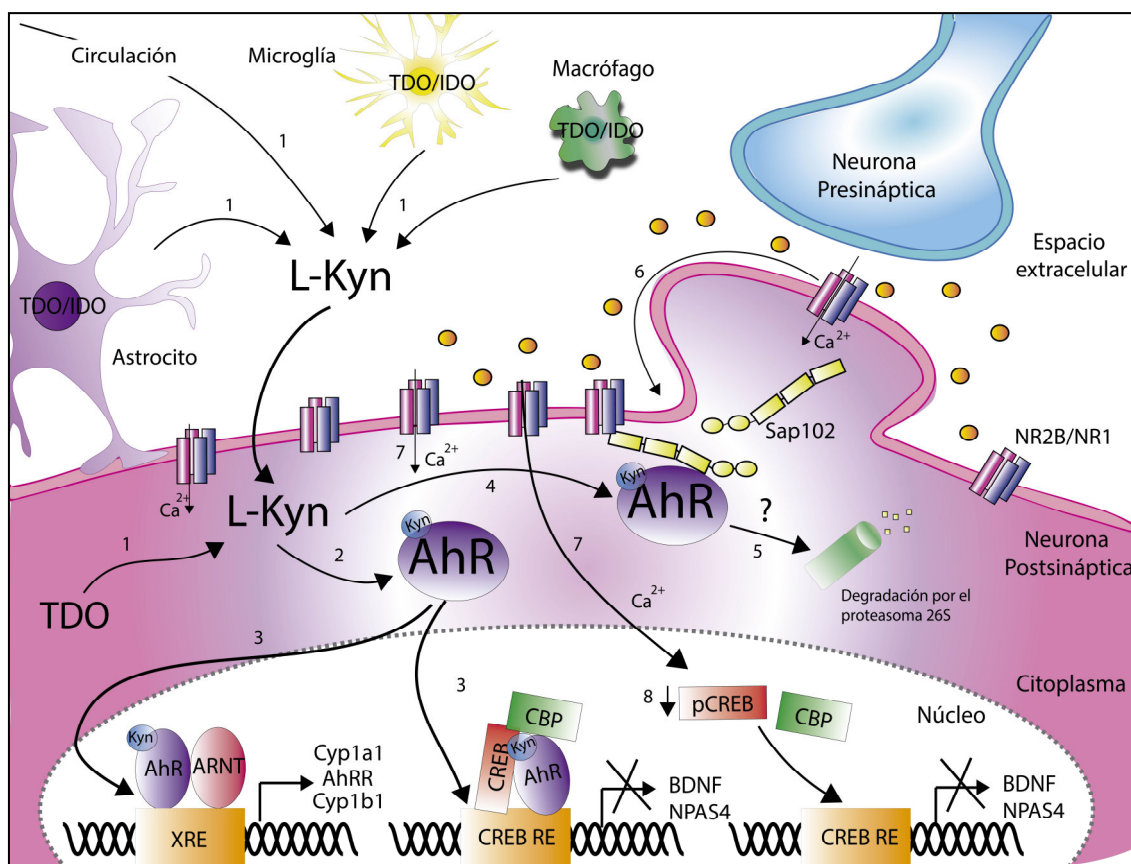
AA Ácido araquidónico	CD36 Clúster de diferenciación 36
ACC Arteria carótida común	CH CH-223191
ACM Arteria cerebral media	Co-ip Co-inmunoprecipitación
ADN Ácido desoxirribonucleico	Cox Cicloxigenasa
AID Inhibidores de muerte regulados por actividad	CPu Caudado-Putamen
AIF Factor inhibidor de la apoptosis	CREB Proteína de unión al elemento de respuesta del AMP cíclico
AIP1 Proteína de interacción con AhR	CRM1 Región de mantenimiento del cromosoma 1
AIT Ataque isquémico transitorio	CTD Dominio carboxi-terminal
Ah <i>Aryl hydrocarbon responsiveness</i>	CUL4B <i>Cullin4B</i>
AhR Receptor para hidrocarburos de arilo (<i>Aryl hydrocarbon receptor</i>)	Cyt c Citocromo c
AhRR Represor del receptor para hidrocarburos de arilo	DALYs Años perdidos por discapacidad
AM Acetoximetilester	DAMPs Patrones moleculares asociados a daño
AMPA 2-amino-3-(hidroxi-5-metil-5-metilisoxazol-4-il) propionato	D-AP5 D-(-)-2-amino-5-ácido fosfopentanoico
AP-1 Proteína activadora 1	DAPK1 Proteína quinasa asociada a muerte 1
Apaf-1 Proteasa activadora del factor apoptótico-1	DBD Dominio de unión al ADN
ARA9 Proteína asociada al receptor AhR	DDB Proteína de unión al ADN dañado 1
ARNm Ácido ribonucleico mensajero	dFICZ 6,12-diformilindolo-[3,2-b] carbazol
ARNT Traslocador del receptor de hidrocarburos de arilo	DIV Días <i>in vitro</i>
A.S.C.O <i>Atherosclerosis-small vessel disease-cardiac source-other</i>	DMSO Dimetilsulfóxido
ASIC Canales iónicos sensibles al ácido	DRE Elementos de respuesta a dioxina
ATF3 Factor de transcripción activador 3	DV Ductus venoso
ATP Trifosfato de adenosina	EAATs Transportadores de aminoácidos excitatorios
Bax Proteína asociada a bcl-2	ECM Matriz extracelular
Bcl-6 <i>B cell lymphoma 6</i>	ECV Enfermedad cerebrovascular
Bcl-x <i>B cell lymphoma X</i>	EDTA Ácido etilendiaminotetraacético
BDNF Factor neurotrófico derivado del cerebro	EKG Electroencefalograma
BHE Barrera hematoencefálica	EGTA Ácido etilenglicoltetraacético
bHLH Dominio hélice bucle hélice	ELISA Enzimoinmunoensayo
Bid BH3 <i>interacting-domain</i> death agonist	ERK Quinasa activada por señales extracelulares
Bim Proteína activadora de tipo BH3	ERNs Especies reactivas de nitrógeno
BMAL Proteína similar a ARNT de cerebro y músculo	EROs Especies reactivas de oxígeno
BME <i>Basal medium Eagle</i>	FasL Ligando de Fas
BSA Albúmina de suero bovino	FDA <i>United states Food and Drug Administration</i>
Btg2 <i>B-cell translocation gene 2</i>	FICZ 6-formilindolo-[3,2-b] carbazol
CA Comisura anterior	Fluo-4AM Fluo-4 acetoximetilester
CAMKIV Calmodulina quinasa IV	FSC Flujo sanguíneo cerebral
CASK Serina quinasa de calcio	FSC <i>Forward Scatter</i>
CBA Ensayo de unión a citoquinas	FOXO <i>Forkhead Box O</i>
CBP Proteína de unión a CREB	Gadd45 <i>Growth Arrest and DNA Damage</i>
Cc Cuerpo calloso	GADPH Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
CD11b Clúster de diferenciación 11b	GFAP Proteína ácida fibrilar de la glía

* Algunas abreviaturas no han sido traducidas al castellano por la falta de sentido de la traducción.

GK Guanilato quinasa	MAP quinasas Proteínas quinasas activadas por mitógeno
HAHs Hidrocarburos aromáticos halogenados	MCAO Oclusión de la arteria cerebral media
HEPES Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfónico	MMPs Metaloproteinasas de matriz
HI Hemisferio infartado	mNSS <i>Modified Neurological Severity Score</i>
Hif-α Factor inducible por hipoxia α	M.O.M <i>Mouse on mouse</i>
HMGB1 Proteína B1 del grupo de alta movilidad	mPins Homólogo en mamíferos del "compañero" de <i>inscutable</i> en <i>Drosophila melanogaster</i>
HPLC Cromatografía líquida de alta eficacia	NAD Adenina dinucleótido nicotinamida
HRP Peroxidasa de rábano	NADPH Nicotina adenina dinucleótido
HS Suero de caballo	NCoA2 Coactivador de receptores nucleares 2
HSP90 Proteína de choque térmico de 90 KDa	NeuN Núcleo neuronal
IAA Ácido indolacético	NFAT Factor nuclear de células T activadas
Iba1 Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado tipo 1	NFI-A Factor nuclear 1 de tipo A
ICAM-1 Molécula de adhesión intracelular	NF-κB Factor nuclear kappa B
IDO Indoleamina-2,3-dioxigenasa	NIHSSS <i>National Institute of Health Stroke Scale Score</i>
IFN-γ Interferón gamma	NINDS <i>National Institute of Neurological Disorders and Stroke</i>
IgG Inmunoglobulina G	NLRP3 <i>NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3</i>
IL1β Interleuquina 1 β	NMDA N-metil-D-aspartato
IL2 Interleuquina 2	NO Óxido nítrico
IL6 Interleuquina 6	NOS Óxido nítrico sintasas
IL18 Interleuquina 18	NPAS4 Proteína PAS neuronal 4
INE Instituto Nacional de Estadística	NR Subunidad del receptor NMDA
Inhib1 Inhibina 1	NTD Dominio N terminal
Inyección i.p Inyección intraperitoneal	OCSF <i>Oxfordshire Community Stroke Project</i>
iNOS Sintasa de óxido nítrico inducible	OGD Privación de oxígeno y glucosa
IP3 Fosfatidilinositol trifosfato	OMS Organización Mundial de la Salud
IV Intravenoso	p160/SRC-1 Coactivador del receptor de estrógenos 1
KIF17 Proteína de tipo quinesina 17	P2 Fracción enriquecida en membranas
KPBS Solución salina en tampón fosfato con potasio	P2X7 Receptor de tipo purinérgico P2X
KYNA Ácido kinurénico	P53 Proteína 53
LBD Dominio de unión al ligando	PAHs Hidrocarburos aromáticos policíclicos
LCR Líquido cefalorraquídeo	PAMPs Patrones moleculares asociados a patógenos
LDH Lactato deshidrogenasa	PAS Per/ ARNT /Sim
mLIN Homólogo en mamíferos de Lin10 de <i>Drosophila melanogaster</i>	PBS Solución salina en tampón fosfato
L-Kyn L-kinurenina	PCBs Bifenilos policlorados
LOX Lipoxigenasa	pCIP Proteína de interacción con CBP
LTB4 Leucotrieno B4	PCR Reacción en cadena de la polimerasa
LTP Potenciación a largo plazo	PDZ <i>Protein Disc Large, Zona occludens 1</i>
LXA₄ Lipoxina A ₄	P/E Penicilina/Estreptomicina
M1 Corteza motora primaria	Per Periodo
M2 Corteza motora secundaria	PFA Paraformaldehído
MAGUK Guanilato quinasa asociada a membrana	

p.i Peri-infarto	STAIR <i>Stroke Therapy Academic Industry Roundtable</i>
PI Yoduro de propidio	Tampón TE Tampón Tris-EDTA
PSD Densidad postsináptica	TBS Solución de Tris tamponada
PKA Proteína-quinasa A	TBL3 Proteína similar a β -transducina 3
PKC Proteína-quinasa C	TCDD 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
pMCAO Oclusión permanente de la arteria cerebral media	TDO Triptófano-2,3-dioxigenasa
P-TEFb Factor de elongación II	TGF-β Factor de crecimiento transformante β
Puma Modulador de la apoptosis regulado por p53	TIF Fracción insoluble en tritón, membranas sinápticas
PVDF Polifluoruro de vinilideno	TLRs Receptores <i>Toll-like</i>
RBX1 <i>Ring box protein 1</i>	TMF 6,2',4'-trimetoxiflavona
RIP140 Proteína de interacción con receptores nucleares	Txnip Proteína de interacción con tiorredoxina
RMN Resonancia magnética nuclear	TNFα Factor de necrosis tumoral alfa
r-tPA Activador tisular del plasminógeno recombinante	TOAST <i>Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment</i>
RT-PCR Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real	TRP Receptores de potencial transitorios
S1 Corteza somatosensorial primaria	TSF Fracción tritón soluble, membranas extrasinápticas
S2 Corteza somatosensorial secundaria	TTC Cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio
SAP Proteína asociada a la sinapsis	UV Ultravioleta
Sec8 Subunidad 8 del complejo de exocitosis	UTP Uridina-5-trifosfato
SEP Potenciales somáticos evocados	VEGF Factor de crecimiento endotelial vascular
SFB Suero fetal bovino	VGLUTs Transportadores vesiculares de glutamato
SH3 Dominio homólogo al Src 3	VL Ventrículo lateral
Sim <i>Single-minded</i>	WT <i>Wild type</i> (fenotipo salvaje)
SNC Sistema nervioso central	XAP2 Proteína asociada al virus de la hepatitis B
Src Tirosina quinasa (su nombre procede de sarcoma)	XRE Elementos de respuesta a xenobióticos
SSC <i>Side Scatter</i>	

RESUMEN



Sumario gráfico: Activación de la vía L-Kyn-AhR tras la isquemia cerebral (los diferentes puntos señalados en la figura del 1 al 8 se describen en el texto). Abreviaturas mostradas en la figura: **AhR** (Receptor para hidrocarburos de arilo); **AhRR** (Represor del receptor AhR); **ARNT** (Traslocador nuclear del receptor AhR); **BDNF** (Factor neurotrófico derivado del cerebro); **CBP** (Proteína de unión a CREB); **CREB** (Proteína de unión al elemento respuesta del AMP cíclico); **CREB RE** (Elementos de respuesta a CREB); **Cyp1a1** y **Cyp1b1** (Citocromos p450 de tipo 1a1 y 1b1); **IDO** (Indolamina-2,3-dioxigenasa); **Kyn/L-Kyn** (L-kinurenina); **NPAS4** (Proteína PAS neuronal 4); **NR1/NR2B** (Receptores NMDA compuestos por las subunidades NR1 y NR2B); **pCREB** (CREB fosforilado); **Sap102** (Proteína asociada a la sinapsis 102); **TDO** (Tryptófano-2,3-dioxigenasa); **XRE** (Elementos de respuesta a xenobióticos).

El receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) es un factor de transcripción que pertenece a la familia de proteínas altamente conservadas bHLH (dominio hélice-bucle-hélice)/PAS(Per-ARNT-Sim). Una de las principales funciones de AhR es mediar los efectos tóxicos y carcinogénicos de los xenobióticos. Sin embargo, cada vez son más las evidencias que indican un importante papel del

receptor en funciones fisiológicas. Aunque AhR se expresa ampliamente en el SNC (Sistema Nervioso Central) sus funciones a nivel fisiológico y patológico en esta estructura son aún desconocidas. Con el fin de profundizar en la función fisiológica y patológica del receptor AhR en el cerebro, decidimos explorar la contribución de AhR al daño isquémico ocasionado por la oclusión permanente de la arteria cerebral media (pMCAO) y la privación de oxígeno y glucosa (OGD).

Los resultados presentados en esta Tesis doctoral muestran por primera vez cómo tras modelos experimentales de isquemia cerebral, la expresión del receptor AhR se incrementa siguiendo un patrón temporal y espacial concreto. Este incremento en la expresión del receptor presenta una localización principalmente neuronal. La inhibición del receptor AhR mediante los antagonistas específicos 2',4',6-trimetoxiflavona (TMF) y CH-223191 (CH) (Murray et al., 2010a; Zhao et al., 2010) o a través del uso de ratones heterocigotos para AhR (Fernández-Salguero et al., 1995) resultó neuroprotectora en nuestros modelos de isquemia cerebral y excitotoxicidad *in vitro* e *in vivo*.

AhR es un receptor activado por ligando, y ya que tras la isquemia el receptor incrementa no solo su traslocación al compartimento nuclear sino también, su actividad transcripcional, decidimos evaluar si la L-kinurenina, un metabolito derivado de la degradación del triptófano a través de “la ruta de la kinureninas” recientemente descrito como agonista de AhR en diferentes contextos (Adams et al., 2012; DiNatale et al., 2010; Hao et al., 2013; McBerry et al., 2012; Opitz et al., 2011), era el responsable de la activación del receptor AhR tras la isquemia cerebral. En efecto, los niveles cerebrales de L-kinurenina en el cerebro y a nivel plasmático se inducían como consecuencia de la isquemia (**Sumario gráfico, 1**), lo que sugería la posibilidad de que la activación de AhR tras la isquemia cerebral estuviese mediada por este metabolito. Los experimentos realizados *in*

vitro e *in vivo* confirmaron a la L-kinurenina como ligando endógeno de AhR tras la isquemia. De hecho, la modulación de la ruta de las kinureninas mediante la adición de L-kinurenina exógena o mediante la inhibición de la síntesis endógena a través del bloqueo selectivo de la enzima TDO (Tryptófano-2,3-dioxigenasa), modularon la señalización mediada por el receptor AhR. En nuestros modelos de isquemia experimental, la activación de AhR por L-kinurenina, y la inhibición de AhR mediante antagonistas específicos o por la inhibición de la síntesis endógena de L-kinurenina, se tradujeron en un incremento del daño producido por la isquemia y en neuroprotección, respectivamente.

Por tanto la activación de AhR a través de L-kinurenina en la fase aguda del ictus isquémico participa en los mecanismos asociados al daño que median la muerte neuronal.

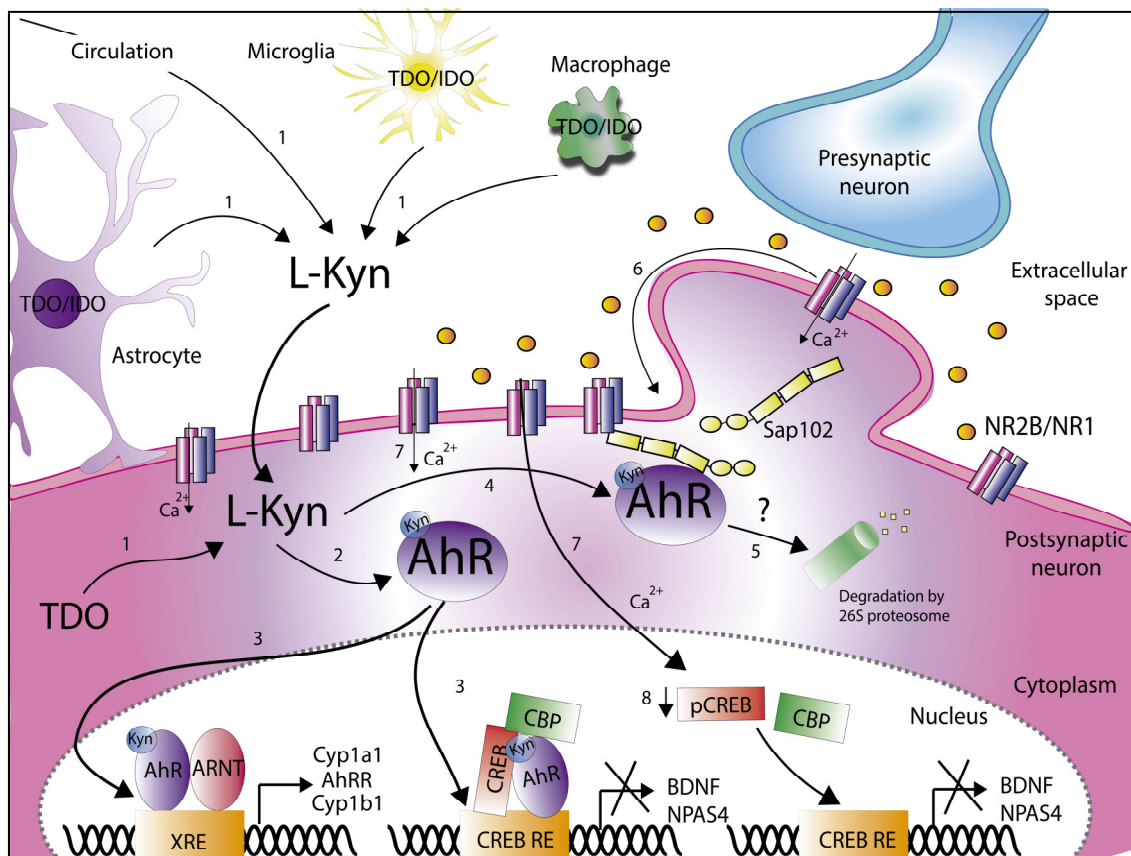
Dentro de los mecanismos a través de los cuales la activación del receptor participa en el daño isquémico se incluyen, por un lado, mecanismos a nivel transcripcional (**Sumario gráfico, 2**) y, por el otro, un novedoso mecanismo que implica el reclutamiento de AhR a la membrana neuronal (**Sumario gráfico, 4**).

En el primero de ellos, la traslocación de AhR al compartimento nuclear, además de incrementar la transcripción de sus genes diana típicos Cyp1a1, AhRR y Cyp1b1 (**Sumario gráfico, 3**), interaccionaría con CBP y CREB. La formación de los complejos AhR/CBP/CREB disminuiría la actividad transcripcional de CREB (**Sumario gráfico, 3**) y, por tanto, la expresión de sus genes diana, entre los que se incluyen BDNF y NPAS4.

En el segundo mecanismo, gracias al reclutamiento de AhR a la membrana al ser activado por ligando (**Sumario gráfico, 4**) y a la interacción del receptor con la proteína MAGUK Sap102, AhR reduciría los niveles totales y de membrana de la proteína Sap102. Aunque no hemos esclarecido el mecanismo a través del

cual se produce esta regulación, es probable que, en este caso, AhR actúe a modo de *E3 ubiquitina ligasa* activada por ligando (Barouki et al., 2007; Bock y Köhle, 2006; Harper et al., 2006; Oesch-Bartlomowicz et al., 2005; Ohtake et al., 2007), promoviendo la degradación de Sap102 a través del proteasoma 26S (**Sumario gráfico, 5**). Esta disminución de los niveles de Sap102 permitiría el movimiento de los receptores NMDA de tipo NR2B desde los sitios sinápticos hasta los extrasinápticos (**Sumario gráfico, 6**), o bien modularía los procesos de endocitosis/exocitosis dependientes de la interacción de Sap102 y NR2B (Rudinskiy et al., 2009; Sans et al., 2005; 2000). El efecto final sería un incremento de los niveles del receptor NMDA de tipo NR1/NR2B en los sitios extrasinápticos tras la activación de AhR. La sobreactivación de estos receptores extrasinápticos mediaría un incremento en la $[Ca^{2+}]$ intracelular (**Sumario gráfico, 7**), disminuyendo la fosforilación del factor de transcripción CREB (**Sumario gráfico, 8**), y dando por tanto lugar a la inhibición de las rutas de supervivencia y la potenciación de las rutas de señalización que conducirían, de manera inevitable, a la muerte de la neurona.

SUMMARY



Graphical abstract: Activation of L-Kyn-AhR pathway after cerebral ischemia (the different points from 1 to 8 are described in the text). Description of figure abbreviations: **AhR** (Aryl hydrocarbon receptor); **AhRR** (AhR repressor); **ARNT** (AhR nuclear translocator); **BDNF** (Brain derived neurotrophic factor); **CBP** (CREB binding protein); **CREB** (AMP cyclic response element binding protein); **CREB RE** (CREB response element); **Cyp1a1** and **Cyp1b1** (Cytochrome p450 1a1 and 1b1); **IDO** (Indolamine-2,3-dyoxigenase); **Kyn/L-Kyn** (L-Kynurenine); **NPAS4** (Neuronal PAS 4 protein); **NR1/NR2B** (NMDA receptor composed by NR1 and NR2B subunits); **pCREB** (phosphorylated CREB); **Sap102** (Synapse associated protein 102); **TDO** (Tryptophan-2,3-dyoxigenase); **XRE** (Xenobiotic response element).

AhR (Aryl hydrocarbon receptor) is a transcription factor that belongs to the bHLH (basic helix-loop-helix)/PAS(Per-Arnt-Sim homology domain) family of highly conserved proteins. One of the main known functions of AhR is to mediate the toxic and carcinogenic effects of xenobiotics. Furthermore, several evidences indicate a physiological role of this receptor in normal cell physiology and function. Although AhR is widely expressed in the CNS

(*Central Nervous System*), its physiological and pathological roles are still unclear. To further define the roles of this receptor in normal and pathologic brain function, we decided to explore the contribution of AhR to cerebral ischemic damage caused by permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO) and oxygen-glucose deprivation (OGD).

The results presented in this Thesis show for the first time that AhR is induced after different experimental models of cerebral ischemia with specific temporal and regional profiles. In this context, AhR is mainly located in neurons placed in peri-infarct areas surrounding *core* region. Pharmacological or genetic loss-of-function approaches using the AhR antagonists 2',4',6-trimethoxyflavone (TMF) and CH-223191 (CH) (Murray et al., 2010a; Zhao et al., 2010) or AhR heterozygous mice (Fernández-Salguero et al., 1995) resulted in neuroprotection in our *in vitro* and *in vivo* models of brain ischemia and excitotoxicity.

Furthermore, cerebral ischemia induced AhR nuclear translocation and its transcriptional activity. Since AhR is a ligand activated transcription factor, we decided to determine whether L-kynurenine (L-Kyn), a metabolite of tryptophan degradation through the so called "*Kynurenine pathway*" and recently described as an AhR agonist in different contexts (Adams et al., 2012; DiNatale et al., 2010; Hao et al., 2013; McBerry et al., 2012; Opitz et al., 2011), was responsible for AhR activation after cerebral ischemia. Indeed, cerebral and plasmatic L-kynurenine levels were induced as a consequence of ischemic damage in mouse (**Graphical abstract, 1**). This result suggests the possibility that, after cerebral ischemia, AhR activation in neurons is mediated by this tryptophan metabolite. Different experimental approaches in our *in vitro* and *in vivo* models confirmed L-kynurenine as an endogenous ligand of AhR after brain ischemia. In addition, exogenous L-kynurenine treatment or, inhibition of endogenous L-kynurenine synthesis by administration of TDO (*tryptophan-2,3-dioxygenase*) inhibitor resulted in AhR-dependent signaling modulation. In our

experimental models of cerebral ischemia, AhR activation by L-kynurenine or endogenous L-kynurenine synthesis inhibition resulted in increased brain damage or neuroprotection, respectively.

Therefore, our data demonstrate that AhR activation by L-kynurenine participates in deleterious mechanisms that mediate neuronal death in the acute phase of cerebral ischemia.

The mechanisms through which AhR activation participates in ischemic damage include transcriptional processes (**Graphical abstract, 2**) but also a novel mechanism by which AhR is recruited to the neuronal membrane (**Graphical abstract, 4**).

In the first ones, nuclear AhR translocation produces an increase in AhR target genes such as Cyp1a1, AhRR and Cyp1b1 (**Graphical abstract, 3**) but, in addition, promotes AhR interaction with CBP (*CREB binding protein*) and CREB (*Cyclic adenosine monophosphate response element binding*). This AhR/CBP/CREB complex decreases CREB transcriptional activity and therefore the expression of the CREB survival target genes BDNF (*Brain derived neurotrophic factor*) and NPAS4 (*Neuronal PAS 4*).

In the second mechanism, AhR activation by an agonist (**Graphical abstract, 4**) induces the recruitment of this receptor to the neuronal plasma membrane. There, AhR interacts with the MAGUK (*Membrane associated guanylate kinase*) protein Sap102 (*synapse associated protein 102*) and, as a consequence, total and membrane Sap102 protein levels are decreased. Although we do not know exactly the mechanism responsible of this AhR dependent regulation of Sap102, it is possible that, in this context, AhR acts like a ligand activated *E3 ubiquitin ligase*, a AhR function that has been previously demonstrated (Barouche et al., 2007; Bock y Kohl, 2006; Harper et al., 2006; Oesch-Bartlomowicz et al., 2005; Ohtake et al., 2007), promoting Sap102 degradation by 26S proteasome system

(**Graphical abstract, 5**). Decreased Sap102 levels allow the movement of NR2B receptors from synaptic to extrasynaptic sites (**Graphical abstract, 6**) or modulate Sap102/NR2B-dependent endocytosis and exocytosis processes (Rudinskiy et al., 2009; Sans et al., 2005; 2000). The final effect is an increase in NMDA receptors composed by NR1/NR2B subunits in extrasynaptic sites. This effect is dependent of AhR activation. Furthermore, overactivation of these extrasynaptic NMDA receptors mediates an increase in intracellular $[Ca^{2+}]$ (**Graphical abstract, 7**) that cause a decrease in CREB phosphorylation (**Graphical abstract, 8**). Therefore, the inhibition of NMDA-dependent survival pathways together with the potentiation of NMDA-induced deleterious mechanisms would lead to neuronal death after AhR activation in cerebral ischemia.

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR	1
1.2 CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR	2
1.3 TRATAMIENTO DEL ICTUS ISQUÉMICO	5
1.4 FISIOPATOLOGÍA DEL ICTUS ISQUÉMICO	8
1.4.1 Isquemia cerebral: Definición de <i>core</i> y penumbra	8
1.4.2 La cascada isquémica	11
1.5 GLUTAMATO: FUNCIÓN FISIOLÓGICA Y PATOLÓGICA	19
1.5.1 Fisiología del glutamato en el sistema nervioso central	19
1.5.2 Excitotoxicidad mediada por el glutamato	22
1.5.3 El receptor ionotrópico NMDA	27
1.6 EL RECEPTOR PARA HIDROCARBUROS DE ARILO (AHR)	47
1.6.1 Perspectiva histórica	47
1.6.2 AhR: Un miembro de la familia de proteínas <i>bHLH/PAS</i>	49
1.6.3 Señalización clásica de AhR dependiente de ligando	51
1.6.4 Señalización alternativa de AhR: Actividad E3 ubiquitina ligasa dependiente de li- gando	60
1.6.5 Regulación de la señal de AhR	61
1.6.6 Papel dual de AhR: Metabolismo de xenobióticos <i>versus</i> papel fisiológico	61
1.6.7 Explorando la función de AhR en el cerebro	67
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	70
2.1 HIPÓTESIS	70
2.2 OBJETIVOS	70
2.2.1 Estudio del receptor AhR en modelos experimentales de isquemia cerebral	70
2.2.2 Evaluación de L-kinurenina como ligando endógeno de AhR en modelos experimentales de isquemia cerebral	70
2.2.3 Estudio de los mecanismos AhR dependientes implicados en el daño cerebral en fase aguda en modelos experimentales de isquemia <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	71
3. MATERIALES Y MÉTODOS	72
3.1 MATERIALES	72
3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>	72
3.2.1 Normativa y animales de experimentación	72
3.2.2 Modelo de isquemia experimental por oclusión permanente de la arteria cerebral media (pMCAO)	74
3.2.3 Evaluación del volumen de infarto	76
3.2.4 Evaluación neurológica	79
3.2.5 Grupos experimentales y tratamientos	80
3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i>	84
3.3.1 Cultivos primarios de neuronas de rata	84
3.3.2 Inducción de isquemia <i>in vitro</i> por privación de oxígeno y glucosa	85

3.3.3	Excitotoxicidad mediada por NMDA	86
3.3.4	Medida de la viabilidad celular por la actividad enzimática de la enzima LDH	87
3.3.5	Medida de la viabilidad celular mediante tinción con yoduro de propidio	87
3.3.6	Grupos experimentales y tratamientos	88
3.4	PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	92
3.4.1	Extracción de ARN mensajero	93
3.4.2	Homogenado de proteínas	94
3.4.3	Extracción de núcleos y citosoles	95
3.4.4	Preparación de extractos enriquecidos en membranas	95
3.4.5	Fraccionamiento subcelular	96
3.4.6	Preparación del tejido y cultivos celulares para estudios de inmunofluorescencia ...	98
3.4.7	Preparación de las muestras para la determinación de triptófano y el metabolito L-Kyn	99
3.4.8	Preparación de las muestras para la determinación de BDNF	99
3.4.9	Obtención de sangre por punción cardiaca para plasma sanguíneo	100
3.5	TÉCNICAS EXPERIMENTALES	100
3.5.1	RT-PCR (<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>)	100
3.5.2	Electroforesis en gel de poliacrilamida y western blot	101
3.5.3	Co-inmunoprecipitación	104
3.5.4	Inmunofluorescencia	104
3.5.5	Detección de triptófano y kinureninas en cerebro y plasma por HPLC	107
3.5.6	Determinación de Ca ²⁺ intracelular	108
3.5.7	Determinación de la concentración de BDNF	109
3.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	109

4. RESULTADOS 110

4.1	PAPEL DEL RECEPTOR AHR EN LA ISQUEMIA CEREBRAL	110
4.1.1	Curso temporal de la expresión de AhR tras pMCAO en ratón	110
4.1.2	Expresión de AhR en cultivos primarios de neuronas de rata tras OGD	116
4.1.3	Perfil temporal de activación de AhR tras pMCAO en ratón	117
4.1.4	Activación de AhR en cultivos primarios de neuronas de rata tras OGD	121
4.1.5	Efecto de la pérdida de función de AhR con antagonistas específicos o tras la dele- ción génica del receptor sobre el volumen de infarto y síntomas sensorimotores	123
4.1.6	Efecto de la inhibición de AhR mediante un antagonista específico tras OGD o tras exposición a NMDA en cultivos primarios de neuronas de rata	129
4.2	L-KYNURENINA COMO POSIBLE LIGANDO ENDÓGENO DE AHR EN ISQUEMIA CEREBRAL	131
4.2.1	Perfil temporal de la concentración cerebral y plasmática de L-triptófano y L- kinurenina tras pMCAO en ratón	131
4.2.2	Expresión de las enzimas que sintetizan L-kinurenina en el cerebro de ratón tras pMCAO	133
4.2.3	Activación de AhR mediada por el metabolito L-kinurenina en modelos experimen- tales de isquemia cerebral <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	134

4.2.4	Efecto de L-Kyn sobre la viabilidad de cultivos neuronales tras OGD o exposición a NMDA: Dependencia de AhR	141
4.2.5	Efecto de L-Kyn sobre el volumen de infarto tras pMCAO en ratón: Dependencia de AhR	143
4.2.6	Efecto de la inhibición de TDO sobre el volumen de infarto tras pMCAO en ratón	144
4.3	MECANISMOS IMPLICADOS EN LOS EFECTOS DE LA MODULACIÓN DE LA VÍA DE L-KYN-AHR EN LA ISQUEMIA CEREBRAL	146
4.3.1	Modulación farmacológica de AhR en la isquemia cerebral: Acciones en el receptor NMDA	146
4.3.2	Otros mecanismos promovidos por la modulación farmacológica de AhR en la isquemia cerebral: Mecanismos a nivel transcripcional	166
5.	DISCUSIÓN	171
5.1	EXPRESIÓN Y ACTIVACIÓN DE AHR TRAS MODELOS EXPERIMENTALES DE ISQUEMIA CEREBRAL	171
5.1.1	Patrón de expresión de AhR tras isquemia cerebral	171
5.1.2	Localización neuronal de AhR tras isquemia cerebral	173
5.1.3	Activación del receptor AhR tras isquemia cerebral	174
5.2	AHR COMO MEDIADOR DEL DAÑO EN FASE AGUDA EN MODELOS EXPERIMENTALES DE ISQUEMIA CEREBRAL	176
5.2.1	Neuroprotección mediada por antagonistas de AhR en isquemia cerebral y excitotoxicidad <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	176
5.2.2	Neuroprotección mediada por la delección parcial del receptor AhR en ratones heterocigotos	177
5.3	L-KINURENINA COMO LIGANDO ENDÓGENO DE AHR TRAS ISQUEMIA CEREBRAL	178
5.3.1	La ruta de las kinureninas tras isquemia cerebral en ratón	178
5.3.2	Caracterización de L-kinurenina como ligando de AhR tras isquemia cerebral experimental	182
5.3.3	Efecto de la administración de L-Kyn en modelos experimentales de isquemia cerebral	184
5.4	MECANISMOS PROMOVIDOS POR EL EJE L-KINURENINA - AHR EN MODELOS EXPERIMENTALES DE ICTUS ISQUÉMICO	187
5.4.1	Efecto en la elevación de $[Ca^{2+}]$ mediada por NMDA: Dependencia de AhR	187
5.4.2	Modulación de los receptores NMDA: Dependencia de AhR	189
5.4.3	Modulación de las proteínas de anclaje MAGUK: Dependencia de AhR	194
5.4.4	Modulación de la ruta promovida por CREB: Dependencia de AhR	198
5.4.5	Papel fisiológico de AhR en el cerebro: Futuros estudios	201
6.)	CONCLUSIONES	203
7.)	REFERENCIAS	205



INTRODUCCIÓN

1.1 ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

La Organización Mundial de la Salud (OMS) (1989) define la **Enfermedad Cerebrovascular** (ECV), también conocida como ictus, como “el rápido desarrollo de signos focales o globales de compromiso de la función cerebral, con síntomas de 24 horas o más, o que lleven a la muerte sin otra causa que el origen vascular”. La gravedad del episodio varía desde la discapacidad grave y la muerte hasta la recuperación parcial a casi completa.

Las enfermedades cerebrovasculares representan una de las principales causas de muerte a nivel mundial, con un importante impacto social y económico para los sistemas sanitarios (OMS). Actualmente, la ECV es considerada la cuarta causa de muerte en los Estados Unidos (después del infarto agudo de miocardio, el cáncer y las enfermedades respiratorias crónicas) (Go et al., 2012). En España, según los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), en el año 2011 la ECV fue la primera causa de muerte en mujeres y la segunda causa de muerte en hombres, ocupando, en términos generales, el segundo lugar tras las enfermedades isquémicas cardíacas.

La ECV se posiciona además como una de las primeras causas de discapacidad en países industrializados de bajos y medianos ingresos. Si centramos nuestra atención en los supervivientes a la ECV, solo el 45% de los mismos consiguen una completa recuperación, experimentando el 55% restante una discapacidad cuya gravedad se distribuye en leve 21%, moderada 12% y severa 22% (Francescutti et al., 2005). Como consecuencia, el número de DALYs (años perdidos por discapacidad) debidos a la ECV a nivel mundial es de aproximadamente 46,6 millones, representando de manera aproximada un 3,1% de los DALYs totales (Johnston et al., 2009). Por tanto, esta discapacidad supone una reducción significativa de la habilidad para integrarse de manera efectiva en la sociedad. Este hecho lleva implícito no solo un coste a nivel personal y

familiar, sino un coste a nivel social con claras repercusiones económicas. Se estima que aproximadamente un 3-4% del gasto sanitario total estaría destinado a este tipo de patologías (Alvarez Sabín et al., 2006). Tanto es así, que el coste directo e indirecto asociado a la ECV en el año 2003 supuso 34 billones de euros para la unión Europea y 62,7 billones en el caso de Estados Unidos (Rosamond et al., 2007). En base a estos datos, el futuro resulta poco alentador, previéndose en Estados Unidos como consecuencia de la ECV un gasto de aproximadamente 2,2 billones de dólares en el periodo comprendido entre 2005 y 2050 (Flynn et al., 2008).

1.2 CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

La ECV se clasifica principalmente en base a su temporalidad, etiología o sintomatología. Existen numerosas clasificaciones de la ECV entre las que destacan, las realizadas por el *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NINDS) (1990), la clasificación del ensayo multicéntrico TOAST (*Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment*) (1993) (Adams et al., 1993), la clasificación OCSF del *Oxfordshire Community Stroke Project* (1983) y la clasificación A.S.C.O (*Atherosclerosis-small vessel disease-cardiac source-other*) (Amarenco et al., 2009a, b; Donnan et al., 2008).

La clasificación propuesta por el NINDS (1990) define la ECV en función de diversos aspectos etiológicos, patogénicos y sintomáticos. Tomando como referente este tipo de clasificación, en función de su naturaleza, la ECV se divide en: *enfermedad cerebrovascular de tipo isquémico* y *enfermedad cerebrovascular de tipo hemorrágico* (Figura 1.1) (Chen et al., 2012b; Donnan et al., 2008; Revisado en Díez-Tejedor et al., 2001).

La ECV de tipo *isquémico* se debe a una reducción parcial o total del flujo sanguíneo en determinadas regiones cerebrales, que se acompaña con un déficit

de oxígeno y glucosa. A diferencia, la ECV de tipo *hemorrágico* se produce por la ruptura de un vaso sanguíneo que libera sangre dentro del parénquima cerebral o ventrículos cerebrales (*hemorragia cerebral*) o en el compartimento subaracnoideo (*hemorragia subaracnoidea*), produciendo daño a través de la extravasación de sus componentes. El ictus isquémico es el más frecuente, contando con un 80% de las enfermedades cerebrovasculares frente al 15% para la hemorragia cerebral y el 5% para la hemorragia subaracnoidea (Amarenco et al., 2009a; Donnan et al., 2008).

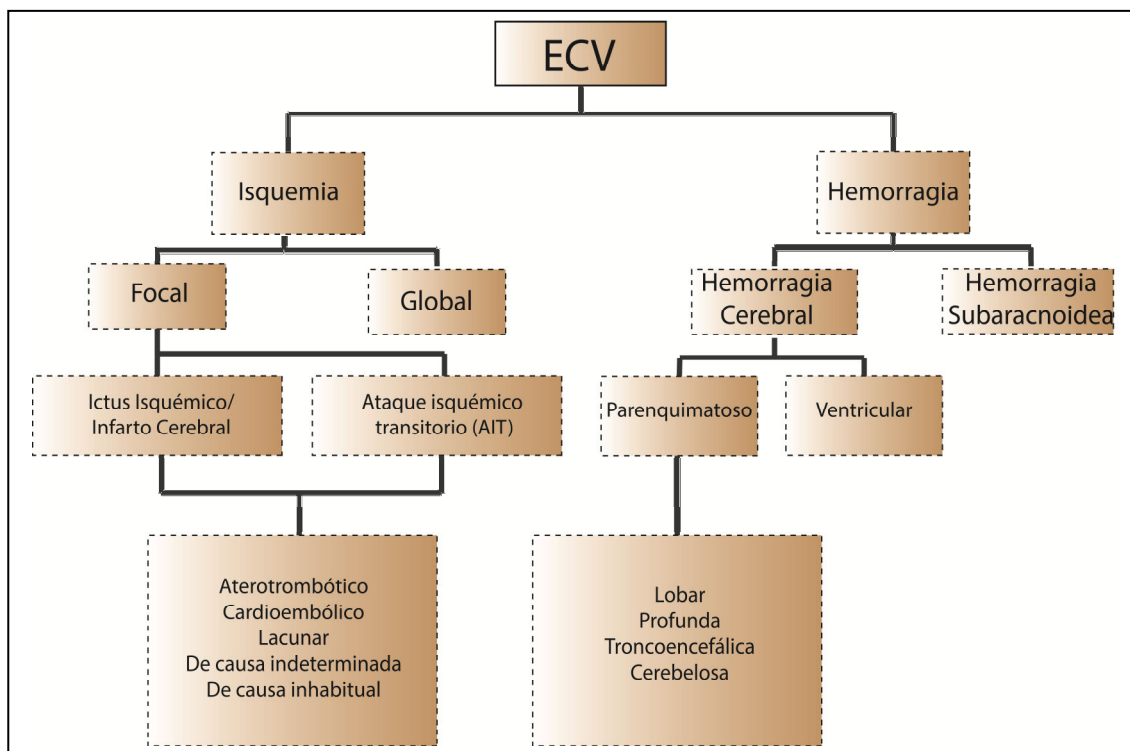


Figura 1.1 Clasificación de la enfermedad cerebrovascular (Chen et al., 2012b; Donnan et al., 2008; Díez-Tejedor et al., 2001).

La isquemia, dependiendo de la extensión de la zona infartada, puede dividirse en *isquemia focal* o *isquemia global*. La isquemia focal, o ictus isquémico, afecta a una región concreta del cerebro como consecuencia de la obstrucción de un vaso por embolia o trombosis, produciendo una reducción completa o intensa del flujo sanguíneo en esa zona. El tamaño de la lesión vendrá determinado por el calibre del vaso ocluido, así como por la circulación

colateral. Dependiendo de la duración del ictus isquémico, se distingue entre, el *ataque isquémico transitorio* (AIT) o *infarto cerebral establecido* (ictus isquémico propiamente dicho). En el primer caso, la duración del proceso es menor de 24 horas, presentando un carácter reversible por lo que, tras su finalización, no existe un déficit neurológico (revisado en Díez-Tejedor et al., 2001). Sin embargo, en el infarto cerebral establecido, la oclusión del vaso se prolonga durante más de 24 horas, produciéndose la necrosis del tejido y acompañándose por secuelas neurológicas.

La *isquemia global* se produce cuando la disminución del flujo sanguíneo se genera de manera simultánea en todo el cerebro. Afecta a los hemisferios cerebrales de forma difusa y puede estar asociado, o no, a una lesión del tronco encefálico y del cerebelo. Con frecuencia, es el resultado de la disminución de la circulación sistémica debido a la reducción del volumen o de la presión sanguínea, por paro cardíaco o hipotensión sistémica grave, o por la oclusión de las principales arterias que irrigan el cerebro. La isquemia global puede ser completa, cuando la reducción del flujo es total, o incompleta, cuando existe un flujo sanguíneo residual. Las consecuencias clínicas abarcan desde un déficit cognitivo leve (memoria, atención), hasta el estado vegetativo persistente por necrosis neocortical e incluso, si la duración es elevada, muerte cerebral por afectación troncoencefálica (Zemke et al., 2004).

Finalmente, según la causa subyacente, el *ictus* isquémico se puede clasificar en *aterotrombótico*, *cardioembólico* y *lacunar*. Cuando el infarto es debido a otras causas menos frecuentes se incluye en la categoría de *infarto de causa inusual*. En el caso de que no se pueda asignar a ninguna de estas categorías, se clasifica como *infarto de origen indeterminado*.

1.3 TRATAMIENTO DEL ICTUS ISQUÉMICO

Pese a sus devastadores efectos a nivel mundial, el ictus isquémico continúa siendo uno de los mayores retos médicos. Tras años de intensas investigaciones centradas en la búsqueda de fármacos para el tratamiento de esta patología, en 1995 el NINDS (1995) publicó por primera vez un tratamiento agudo beneficioso para pacientes de ictus isquémico. Este tratamiento consistía en la recanalización de la arteria ocluida mediante *la administración intravenosa (IV) del r-tPA (activador tisular del plasminógeno recombinante, alteplasa)*. La administración IV del r-tPA se aprobó en 1996 por la FDA (*Food and Drug Administration*) estadounidense como tratamiento en fase aguda para pacientes con ictus isquémico, con la subsecuente aprobación del resto de agencias a nivel mundial. En la actualidad, la reperusión de la arteria ocluida mediante la administración intravenosa de r-tPA es el único tratamiento aprobado para el manejo en fase aguda del ictus isquémico (revisado en Cohen et al., 2011).

La base mecanística del r-tPA radica en su capacidad para transformar el plasminógeno en plasmina. En el compartimento vascular, los trombos están formados por la agregación de plaquetas y la formación de una malla de fibrina generada a partir del fibrinógeno. La plasmina generada vía r-tPA produce la fibrinólisis del trombo y, por tanto, la recanalización de la arteria ocluida (Lemarchant et al., 2012). Desgraciadamente, dado su mecanismo de acción, el r-tPA presenta una corta ventana terapéutica (<4,5 horas de evolución) (Hacke et al., 2008). De hecho, la administración del r-tPA a partir de las 4,5h desde el inicio de la isquemia incrementa la probabilidad del “daño por recanalización”, que se manifiesta con la rotura de la barrera hematoencefálica, un proceso de transformación hemorrágica y un edema cerebral masivo (revisado en Molina y Alvarez-Sabín, 2009). Como consecuencia, los criterios de inclusión de pacientes en fase aguda del ictus isquémico para el tratamiento mediante trombolíticos

son sumamente exigentes (Committee and Committee, 2008; Quinn et al., 2009). De hecho, muy pocos pacientes son los beneficiados: sólo entre el 20 y el 25% de los pacientes llegan a tiempo a un centro hospitalario dentro de la ventana terapéutica indicada para su administración. De éstos, solo entre el 3 y 5% son candidatos a trombolisis. Y una vez tratados, solo se produce la reperusión del vaso ocluido en un 50% de los pacientes (Hacke et al., 2008). Por tanto, es evidente y necesario mejorar la seguridad, eficacia y accesibilidad a las terapias de recanalización. El desarrollo de nuevos agentes trombolíticos, nuevas metodologías y criterios para la selección de pacientes y la utilización de otras vías de reperusión, como la intraarterial o la reperusión mecánica (ver revisiones de Marsh and Keyrouz, 2010; Molina and Alvarez-Sabín, 2009; Patel and Saver, 2013), podrían incrementar el éxito de las terapias trombolíticas.

Puesto que los mecanismos lesionales del ictus presentan una progresión rápida, y los tratamientos disponibles de recanalización presentan una corta ventana de administración, es necesaria la presencia de centros hospitalarios capacitados que permitan la evaluación y tratamiento del paciente en el mínimo tiempo de respuesta. A este respecto, ha resultado sumamente efectivo la implantación del llamado «*código ictus*» en nuestro país, que hace referencia a la actuación coordinada de los servicios de urgencias extrahospitalarios con los centros hospitalarios (unidades de ictus) que atenderán al paciente (Ringelstein et al., 2013). En la actualidad, el tratamiento del infarto cerebral se basa en la atención especializada en las unidades de ictus, la aplicación urgente de cuidados generales para mantener la homeostasis (monitorización y tratamiento de la tensión arterial sistólica y/o diastólica, evitar hiperglucemia y controlar la temperatura), el tratamiento trombolítico intravenoso en las primeras 4,5 horas si el paciente cumple los criterios de inclusión y la recanalización intra-arterial farmacológica o mecánica en casos determinados (Jauch et al., 2013)

Como consecuencia de los escasos recursos para el tratamiento en fase aguda del ictus, en paralelo a las terapias de recanalización surge el concepto de la *neuroprotección*. Los agentes neuroprotectores tratan de limitar el daño isquémico al prevenir la muerte de las neuronas que rodean al núcleo del infarto, disminuyendo por tanto la lesión isquémica. En el proceso isquémico existen gran cantidad de posibles dianas mediadoras de daño que pueden ser modificadas farmacológicamente para inducir neuroprotección (Fisher et al., 2003; 2009).

Existen gran cantidad de estudios de tipo básico realizados sobre modelos experimentales de isquemia cerebral, que muestran la efectividad de diferentes agentes de tipo neuroprotector (revisado en O'Collins et al., 2006). Estos estudios abren nuevas posibilidades para el tratamiento del ictus isquémico en fase aguda. Sin embargo, la traslacionalidad a la clínica ha resultado desalentadora. Hasta la fecha, los aproximadamente 200 ensayos clínicos realizados con diferentes agentes presumiblemente neuroprotectores (<http://www.strokecenter.org/trials/>), que habían mostrado resultados positivos en modelos experimentales (O'Collins et al., 2006), no han mostrado beneficio a nivel clínico en fase aguda del ictus isquémico (Minnerup et al., 2012).

El fracaso de la “neuroprotección” en fase aguda del ictus isquémico puede ser debido a múltiples razones. Entre estas destacan, de manera principal, un diseño inapropiado del ensayo clínico y la elección de agentes cuyas evidencias neuroprotectoras a nivel pre-clínico son insuficientes (Sutherland et al., 2012; Turner et al., 2013) (**Tabla 1**).

Como consecuencia, con el fin de homogeneizar los estudios pre-clínicos acercándolos más a una posible traslacionalidad, y de mejorar el diseño de los ensayos clínicos con agentes neuroprotectores, se establecieron las

recomendaciones STAIR (*Stroke Therapy Academic Industry Roundtable*) (Albers et al., 2011).

Modelos animales (Ensayos pre-clínicos)	Estudios humanos (Ensayos clínicos)
Población homogénea altamente controlada	Población variable y heterogénea (sexo, edad...)
Animales jóvenes	Pacientes envejecidos
Comorbilidad limitada	Numerosas comorbilidades
Infarto cerebral inducido	Infarto cerebral espontáneo
Etiología uniforme	Etiología variable
Territorio isquémico afectado - ACM	Territorio isquémico afectado variable
Administración temprana del fármaco	Administración tardía del fármaco
Control de la duración de la oclusión	Tiempo variable de la oclusión
Tamaño de muestra adecuado	Tamaño de muestra inadecuado
Múltiples vías de administración	Rutas limitadas de administración
Rápida disponibilidad del tratamiento en la zona infartada	Lenta disponibilidad del tratamiento en la zona infartada
Pronóstico estimado mediante el volumen de infarto	Pronóstico estimado mediante funcionalidad

Tabla 1.1. Principales razones del fallo en la traslacionalidad de los agentes neuroprotectores en fase aguda del ictus isquémico, de los estudios pre-clínicos en modelos animales a los ensayos clínicos en humanos (Tabla adaptada de la revisión de Sutherland et al., 2012).

Sin embargo, hasta la fecha, no existen evidencias claras de que la estandarización en los procedimientos según marcan las recomendaciones STAIR incremente el porcentaje de éxito en la traslacionalidad. Por tanto, el futuro de la terapia farmacológica de esta enfermedad es todavía incierto, y los principales esfuerzos se enfocan en mejorar la efectividad de la reperfusión y en la búsqueda de tratamientos capaces de actuar tanto como neuroprotectores como neurorreparadores (Albers et al., 2011).

1.4 FISIOPATOLOGÍA DEL ICTUS ISQUÉMICO

1.4.1 Isquemia Cerebral: Definición de Core y Penumbra

En los mamíferos, el cerebro cubre sus necesidades energéticas casi exclusivamente de la oxidación de la glucosa. En el ictus isquémico, la disminución del flujo sanguíneo cerebral (FSC) lleva asociada una drástica reducción en los niveles de oxígeno y glucosa que inevitablemente conduce a un fallo bioenergético y a una supresión metabólica (revisado en Hossmann, 2009). En un adulto normal joven, el FSC es de aproximadamente

70ml/min/100g. Tras un ictus isquémico, la reducción del flujo sanguíneo en la zona infartada da lugar a dos zonas críticas dependiendo del grado de perfusión del tejido, *el core* y **la zona de penumbra** (Astrup et al., 1981; Pulsinelli, 1992).

La primera zona, el denominado *core o núcleo del infarto*, se define como la región en la cual la reducción del flujo sanguíneo es de tal magnitud (15ml/min/100g) que lleva de manera directa a un daño irreversible al no ser capaz de suplir el aporte energético mínimo para mantener el funcionamiento e integridad estructural del cerebro.

La *zona de penumbra* es una región hipoperfundida que se sitúa entre el núcleo isquémico y el parénquima normalmente perfundido. Inicialmente, en la definición clásica de penumbra, esta región era considerada como una región homogénea. En la actualidad, gracias a la implementación de nuevas metodologías, la penumbra es considerada una zona heterogénea dependiendo de su FSC relativo y por tanto de su aporte energético, mostrando una disminución gradual de ambos factores desde el parénquima hacia el *core*. Los diferentes procesos cerebrales de tipo metabólico y electrofisiológico presentan diferentes requerimientos energéticos. Por tanto, a medida que avanzamos desde el parénquima por la penumbra en dirección al *core*, las funciones celulares cuyo requerimiento energético es mayor son las primeras en alterarse, por ejemplo, uno de los parámetros más sensibles es la síntesis proteica. Cuando el FSC se corresponde al 15% del encontrado en una región normalmente perfundida, se desencadena el fallo bioenergético global por déficit de ATP (trifosfato de adenosina), que se acompaña por la despolarización de las membranas, marcándonos el inicio del núcleo del infarto (Hossmann, 1994; Hossmann y Traystman, 2009; Symon et al., 1977) (**Figura 1.2**).

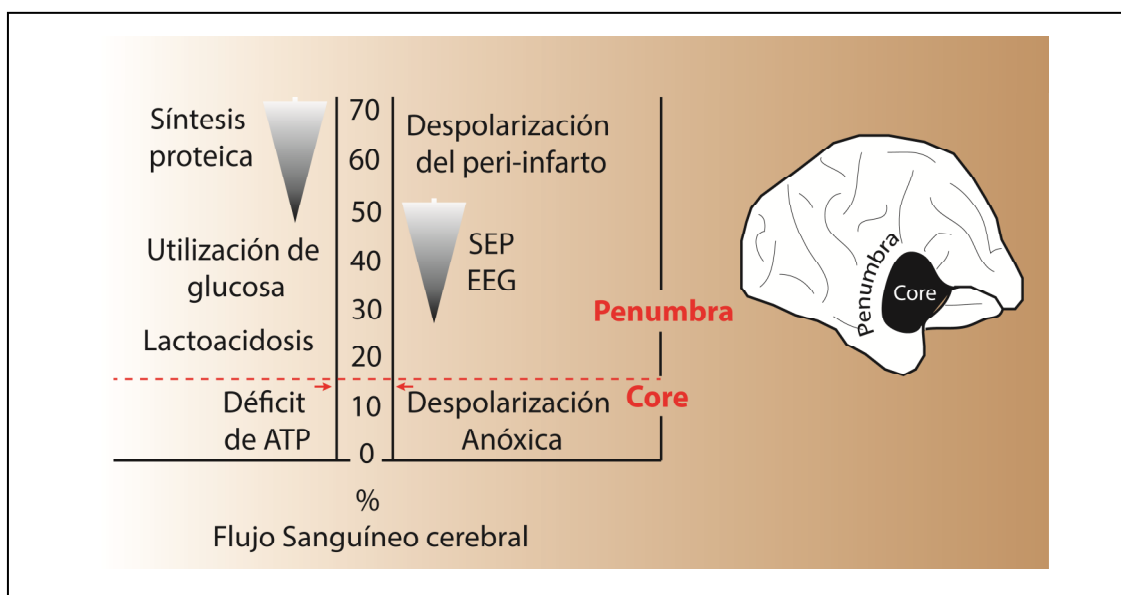


Figura 1.2. Umbrales metabólicos y electrofisiológicos determinados en base al porcentaje de reducción del FSC. La región del *core* es la zona del infarto en la cual la disminución del flujo sanguíneo lleva a un fallo energético y a una despolarización anóxica. En la penumbra, el flujo sanguíneo se encuentra reducido, pero el estado energético está preservado. SEP: potenciales somáticos evocados y EEG: electroencefalograma (Esquema adaptado a partir de Hossmann, 1994; Hossmann y Traystman, 2009; Symon et al., 1977).

Ya que el punto crítico para recuperar al menos de manera parcial la función de la región afectada es el aporte energético, la restauración funcional del *core* solo es posible si el flujo cerebral se restablece en la hora subsiguiente al inicio de la isquemia. En ausencia de reperusión, el daño producido en el *core* es irreversible, y por tanto, cualquier intervención de tipo terapéutico está dirigida a reducir la expansión del *core* hacia la zona de penumbra.

De acuerdo con la dinámica temporal de expansión del infarto descrita por Saver y colaboradores en 2010, el mayor potencial terapéutico lo encontramos dentro de la primera hora tras la isquemia, en donde el volumen de la penumbra ocupa aproximadamente el 50% del territorio isquémico. A partir de ahí, el volumen del tejido salvable disminuye considerablemente y, a partir de las 3 horas, la capacidad de recuperación es marginal (Hossmann, 2012; Saver, 2010; Saver et al., 2010). A medida que la isquemia evoluciona, la funcionalidad del tejido se reduce, promoviendo la expansión del *core* hacia la penumbra (Petzold et al., 2003), hasta que finalmente, transcurridas entre 6-8 horas desde

el inicio de la isquemia, la penumbra desaparece, y el *core* alcanza su máximo volumen (Ver revisiones de Hossmann, 2008, 2009, 2012; Hossmann y Traystman, 2009).

1.4.2 La cascada isquémica

Tras un ictus isquémico, bien sea transitorio o permanente, se producen una serie de eventos bioquímicos y moleculares heterogéneos que transcurren en un tiempo y espacio determinado. A este conjunto de procesos se los conoce comúnmente como “*la cascada isquémica*”. De manera temporal, la cascada isquémica puede resumirse como *un fallo bioenergético* que se continúa con un proceso de *excitotoxicidad*, *estrés oxidativo*, *disfunción de la barrera hematoencefálica*, *daño microvascular*, *inflamación* y, finalmente, *daño celular irreversible* (Figura 1.3 y Figura 1.4) (Revisado en Brouns y De Deyn, 2009; Durukan y Tatlisumak, 2007).

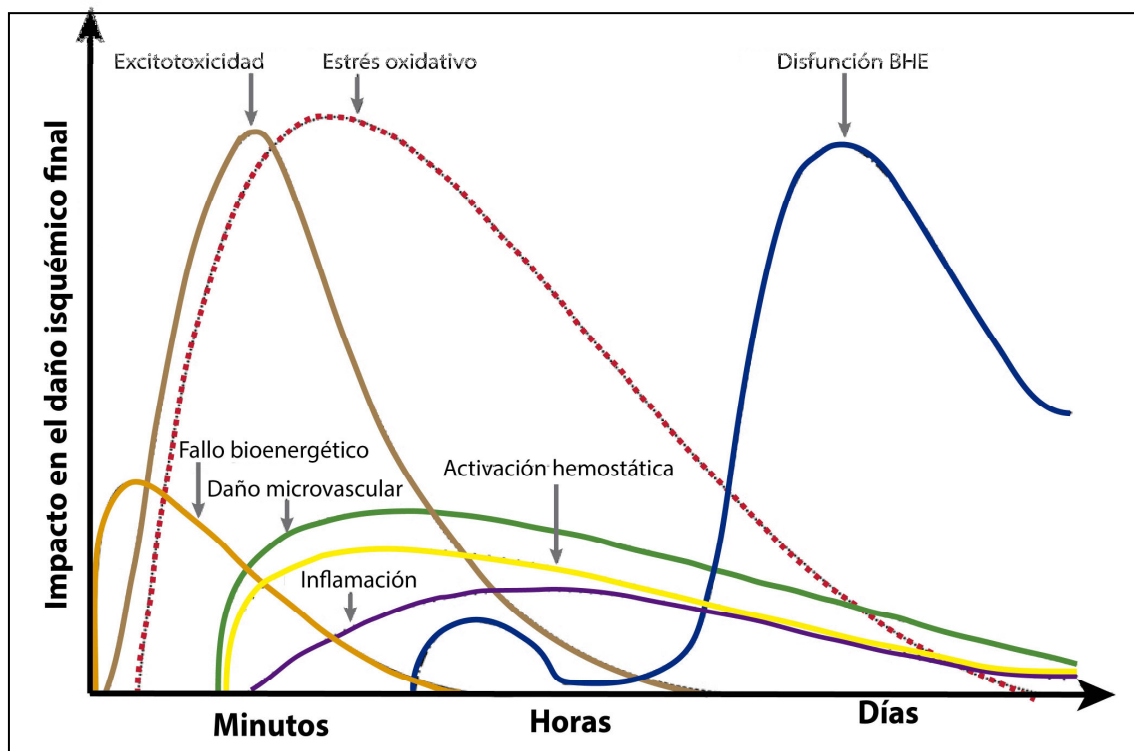


Figura 1.3. Esquema temporal que representa los principales eventos englobados dentro de la cascada isquémica (Adaptado de la revisión de Brouns y De Deyn, 2009).

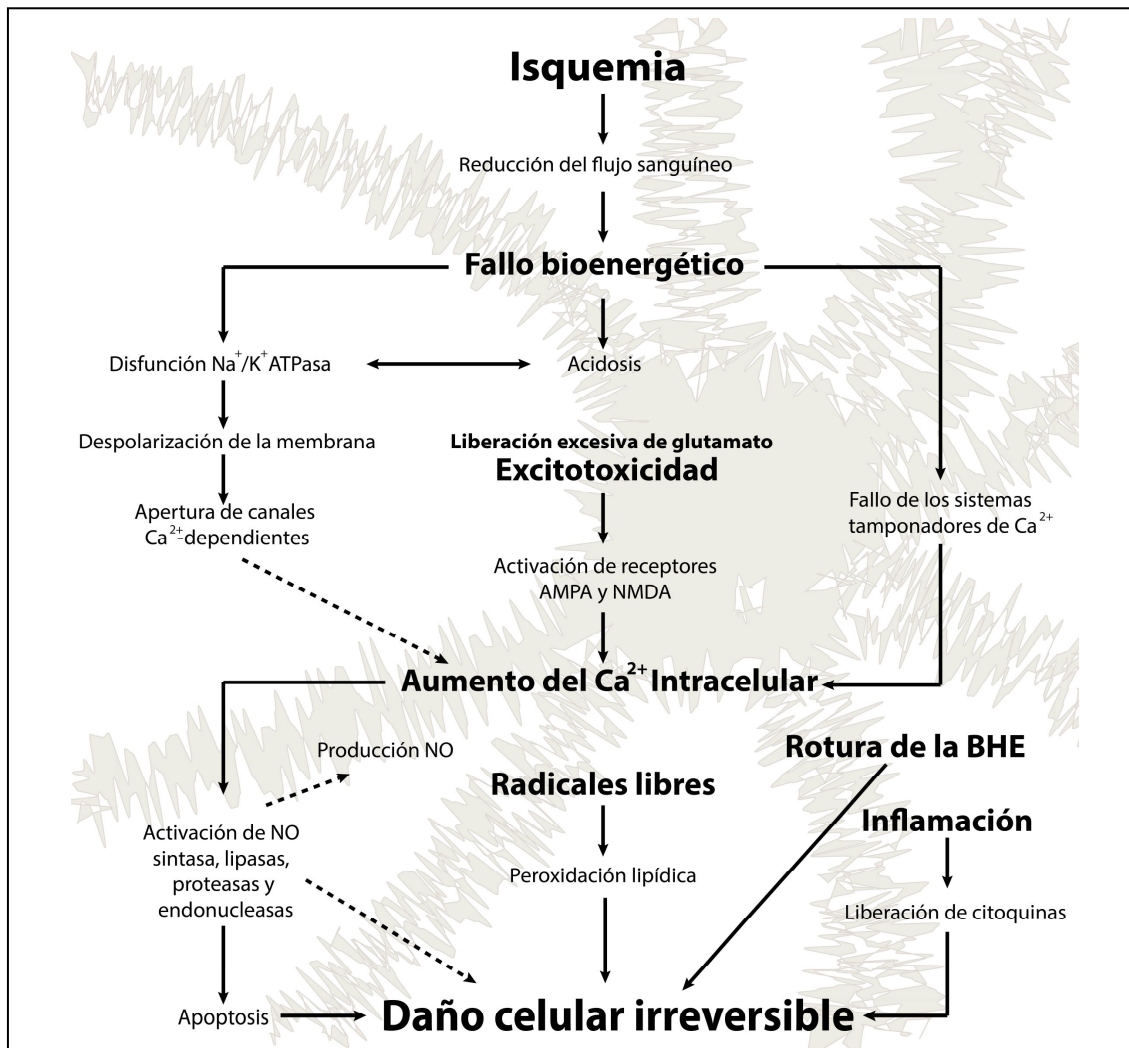


Figura 1.4. Diagrama representativo de los eventos incluidos dentro de la cascada isquémica. Tras el ictus isquémico, el principal mecanismo de muerte celular es el fallo energético. Sin oxígeno ni glucosa, las neuronas no pueden generar el ATP necesario para mantener el gradiente iónico a través de las membranas neuronales; como consecuencia, se produce la despolarización masiva de las membranas, produciendo la liberación del glutamato en el espacio extracelular. La resultante sobreactivación de los receptores NMDA lleva a la elevación de Ca^{2+} intracelular que activará a las enzimas dependientes de este catión y, enzimas productoras de óxido nítrico, especies oxidantes y metabolitos del ácido araquidónico. Estos eventos conducen a la necrosis o a la muerte celular programada (dependiendo de la intensidad del estímulo y del estado metabólico de la neurona). En paralelo, el daño en la barrera hematoencefálica y un robusto proceso inflamatorio se sumaran al proceso destructivo (revisado en Hossmann, 2009, 2012).

Fallo Bioenergético: Tras la isquemia cerebral, el punto inicial que desencadena el resto de procesos bioquímicos y moleculares es el *fallo bioenergético* como consecuencia de la hipoperfusión. Este proceso se produce a causa de la interrupción de la fosforilación oxidativa y el déficit en la síntesis de ATP. La disminución en los niveles de ATP conduce rápidamente a una alteración del

funcionamiento del transporte iónico a través de la bombas dependientes de ATP como la Na^+/K^+ *ATPasa*, produciendo una despolarización masiva neuronal y glial en la zona hipoperfundida. Como consecuencia, los canales dependientes de Ca^{2+} se activan, ocasionando una entrada masiva de Ca^{2+} al citoplasma neuronal. Este hecho incrementa más aun la despolarización de la membrana y produce, una liberación masiva de glutamato y otros neurotransmisores de tipo excitatorio al espacio extracelular (Katsura et al., 1994; Martin et al., 1994).

Excitotoxicidad: La excitotoxicidad hace referencia a un daño causado por el exceso de glutamato en el espacio extracelular procedente de la despolarización y de la muerte neuronal en el *core* isquémico (Choi, 1988a; Meldrum et al., 1985). El exceso de glutamato liberado al espacio extracelular va a actuar principalmente sobre los receptores ionotrópicos glutamatérgicos de tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) y AMPA (2-amino-3-(hidroxi-5-metil-5-metili soxazol-4-il) propionato) (Chen et al., 2008; Choi, 1988a; 1988b; Dirnagl et al., 1999). La sobreactivación de este tipo de receptores glutamatérgicos contribuye a una mayor despolarización de las membranas, incrementando aún más la entrada de Ca^{2+} al espacio intracelular, así como, la liberación de glutamato al espacio extracelular. Estos procesos se traducen por tanto en una amplificación local del daño isquémico inicial. El aumento de Ca^{2+} es un factor clave en los procesos que conducen al daño neuronal irreversible, ya que de manera directa o indirecta participa en la muerte neuronal mediante procesos de necrosis y/o apoptosis (Fisher y Schaebitz, 2000; Martin et al., 1998).

El proceso de excitotoxicidad, las principales consecuencias del incremento en el Ca^{2+} intracelular, así como los diferentes tipos de receptores glutamatérgicos, serán descritos con más detalle en apartados posteriores debido a la relevancia que presentan para esta Tesis doctoral.

Estrés Oxidativo: El estrés oxidativo tiene lugar cuando la producción de radicales libres supera a los mecanismos endógenos anti-oxidantes. Tras la isquemia, se produce un incremento en las especies reactivas de oxígeno (EROs) y de nitrógeno (ERNs) (Kontos, 1985; Love, 1999; Siesjö et al., 1989). Estas especies reactivas van a actuar como importantes mediadores del daño celular. Dentro de las principales EROs producidas tras la isquemia cerebral destacan el superóxido ($O_2^{\bullet-}$) generado a través de la xantina oxidasa y el desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido a partir del superóxido y, el radical hidroxilo ($\cdot OH$) que se genera a partir del peróxido de hidrógeno (Fridovich, 1978). Respecto a las ERNs, una de las principales especies reactivas de nitrógeno es el óxido nítrico (NO), el cual se produce a través de la L-arginina mediante la acción de tres tipos de óxido nítrico sintasas (NOS) diferentes (Beckman y Koppenol, 1996). Entre los principales efectos deletéreos de la producción de radicales libres de oxígeno y nitrógeno destacan la inactivación enzimática, la alteración de la función mitocondrial, la disfunción de la barrera hematoencefálica, la desnaturalización proteica, la peroxidación lipídica, alteraciones en la homeostasis iónica y, cambios en la expresión génica y la señalización celular. Finalmente, la alteración de todos estos procesos pone en marcha en la neurona un mecanismo celular autodestructivo (Evans y Cooke, 2004). Mientras que un estrés oxidativo grave ocasiona de manera directa la muerte por necrosis, una oxidación moderada puede conducir a mecanismos apoptóticos (Evans y Cooke, 2004; Green y Reed, 1998; Liu et al., 1996).

Rotura de la barrera hematoencefálica: La barrera hematoencefálica (BHE) es fundamental para la regulación de la homeostasis cerebral y para el mantenimiento del privilegio inmunológico. A nivel estructural y funcional, la BHE está formada por células endoteliales conectadas a través de las denominadas “uniones estrechas”, dotándola de una baja permeabilidad o una

permeabilidad selectiva para el paso de sustancias al cerebro. Los astrocitos, los pericitos, las neuronas y la matriz extracelular que rodea a los vasos también contribuyen al correcto funcionamiento de la barrera, formando la denominada *unidad neurovascular* (Figura 1.5) (revisado en Iadecola y Anrather, 2011).

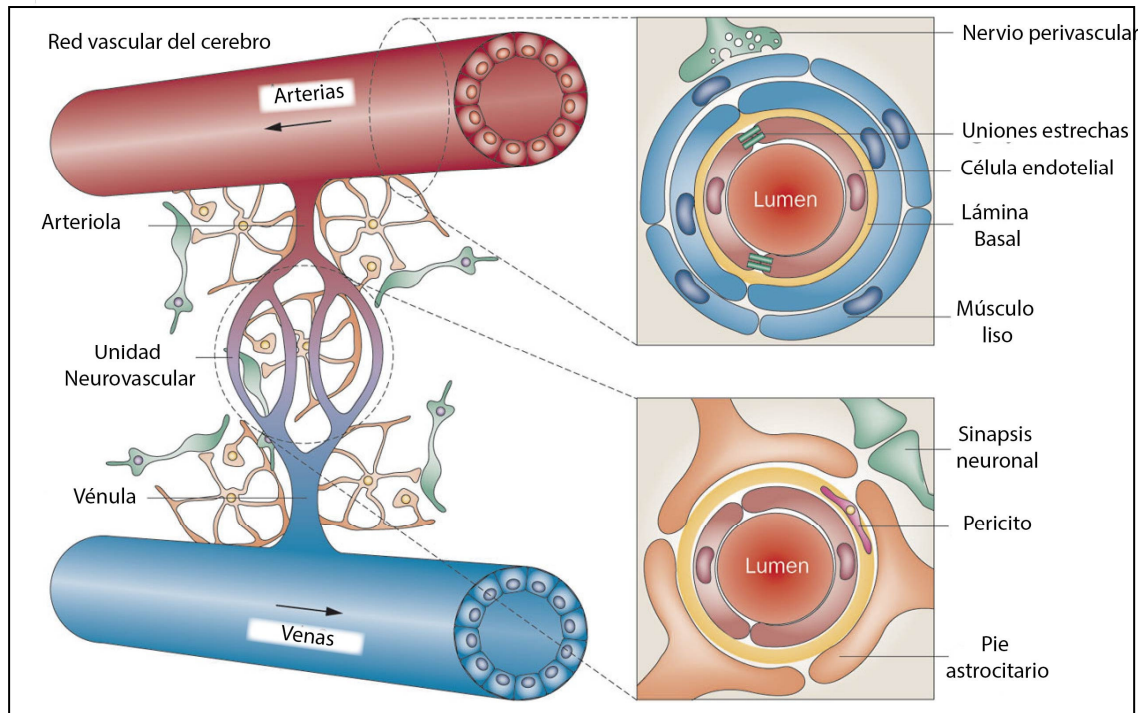


Figura 1.5. La unidad neurovascular (Esquema adaptado de Zhang et al., 2012).

En el ictus, el daño isquémico produce la acumulación de especies reactivas y factores como VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) (Abumiya et al., 1999), activación de MMPs (metaloproteinasas de matriz) y otras proteasas (Fujimoto et al., 2008), y bradikinina (Kamiya et al., 1993) entre otros factores. El incremento y la activación de estas moléculas promueven de manera activa la rotura de la barrera y el incremento de su permeabilidad. Como consecuencia, la pérdida de la permeabilidad selectiva se acompaña por un incremento en la extravasación de proteínas sanguíneas de alto peso molecular. Dichas proteínas se acumulan en el compartimento extracelular y se extienden a modo de gradientes en el tejido isquémico y en el tejido periférico no isquémico. En paralelo y como consecuencia, se produce una excesiva salida de K^+ y entrada

de Na^+ y agua que tiende a acumularse en el parénquima, originando el denominado *edema vasogénico*. A diferencia del *edema citotóxico*, que viene marcado por el incremento intracelular en el contenido de agua como consecuencia de los cambios a nivel iónico, seguido de la despolarización celular y la elevación de ácido láctico (Kim et al., 2008), el edema vasogénico incrementa el daño isquémico como consecuencia de su efecto volumétrico, ocasionando una compresión local de la microcirculación, que lleva a un incremento en la presión intracraneal (ver revisiones de Brouns y De Deyn, 2009; Hossmann, 2009). Adicionalmente, la rotura de la barrera, acompañada por la pérdida de la lámina basal y la degradación de la matriz, facilitan la extravasación de eritrocitos, promoviendo por tanto la transformación hemorrágica (Brouns y De Deyn, 2009).

Daño microvascular: Aparte de lo ya comentado para la BHE como unidad, la microvasculatura experimenta de manera adicional una serie alteraciones funcionales que participan en el daño isquémico. Uno de estos cambios consiste en la pérdida de su capacidad inherente de autorregulación para mantener una perfusión constante del cerebro. Este hecho se traduce en un incremento del tono vascular cerebral que incrementa aún más la alteración del FSC en la zona infartada y en la circulación colateral (Brouns y De Deyn, 2009). Además, en el endotelio vascular se producen especies reactivas que presentan potentes efectos vasoconstrictores, disminuyendo el calibre de determinados vasos (del Zoppo, 2004). Por último, y como veremos de manera más detallada en el apartado de inflamación, la activación del endotelio promueve la expresión de moléculas de adhesión que posibilitan la consiguiente infiltración leucocitaria. La adhesión de las numerosas células inmunes a la pared de la microvasculatura promueve el denominado fenómeno del “no reflujo” mediante el bloqueo de los vasos por parte de estas células (Ames et al., 1968).

Inflamación: A medida que la isquemia progresa, se produce en paralelo una robusta respuesta inflamatoria que tiene como principales implicados, moléculas de señalización, células inmunes y moléculas de adhesión. Como se observa en la **Figura 1.6** las células muertas liberan señales de peligro que activan al sistema inmune.

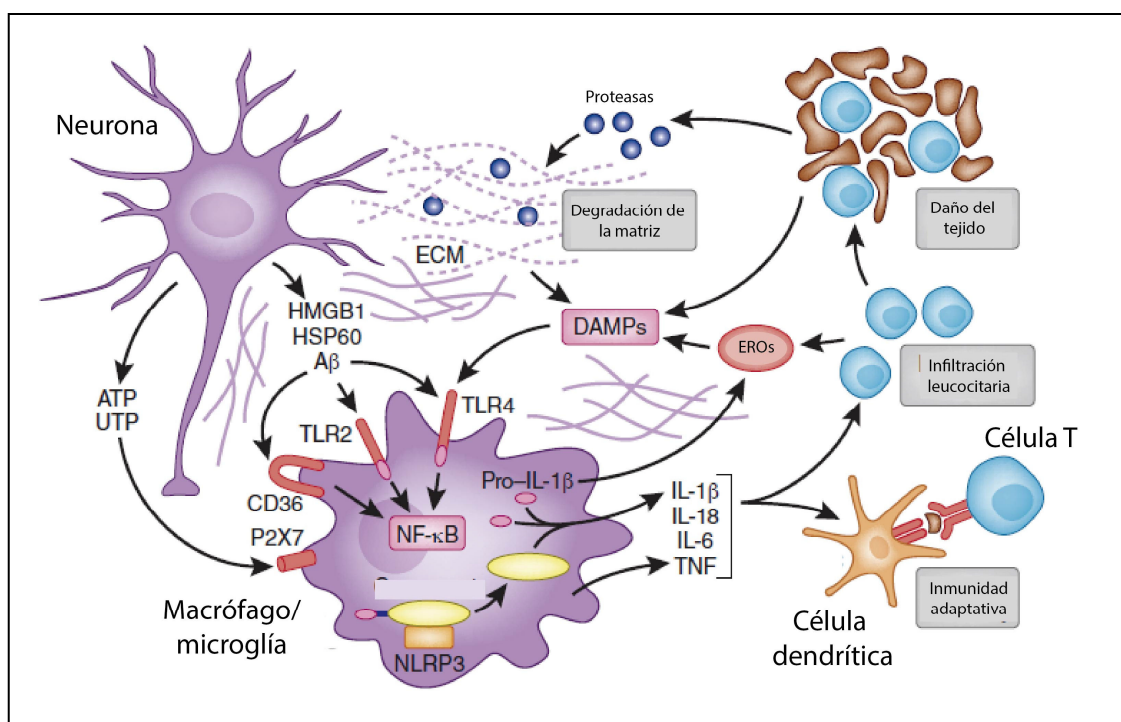


Figura 1.6. Muerte celular y activación de receptores de la inmunidad innata: La muerte isquémica conlleva la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), que activan los receptores TLR, especialmente TLR4 y TLR2. Los DAMPs liberados por la isquemia incluyen a la proteína HMGB1 (una proteína intracelular de unión al ADN), la proteína HSP60 y la proteína β -amiloide ($A\beta$), entre otras. Los receptores TLRs activarán la expresión de genes proinflamatorios mediante la activación del factor nuclear NF- κ B. Los DAMPs también se derivan de la ruptura de la matriz extracelular por enzimas líticas liberadas desde las células muertas y por la acción de las especies reactivas de oxígeno sobre los lípidos. La producción de citoquinas como la IL-1 β (interleuquina 1 β), IL-18 (interleuquina 18), IL-6 (interleuquina 6) y TNF así como la activación del complemento derivada de estos eventos llevan al incremento de la infiltración de leucocitos que aumentan el daño tisular y provocan la producción de más DAMPs (ver revisión de Iadecola y Anrather, 2011).

Más concretamente, existen varios tipos celulares que participan en el proceso inflamatorio tras la isquemia. En un primer momento, los astrocitos y la microglía son activados como consecuencia de las especies reactivas de oxígeno.

Los astrocitos son capaces de producir mediadores de la inflamación como citoquinas, quimioquinas y NOS inducible. Por otro lado, la ruptura de las interacciones entre la neurona y la microglía, cuya principal función es mantener a ésta en estado de reposo, producirá la activación microglial (Cardona et al., 2006; Matsumoto, 1992; Matsumoto et al., 2007;). De manera adicional, y en paralelo a la activación astrocitaria y microglial, la microvasculatura empieza a experimentar cambios entre los que se incluyen la expresión de receptores de adhesión en las células endoteliales, que permitirán la infiltración de las células inmunes circulantes al cerebro isquémico (Wang et al., 2007). Como consecuencia del proceso de activación de las células residentes y de las células endoteliales, se produce la infiltración en el cerebro de células inmunes circulantes (Jin et al., 2010). Finalmente, tras la activación de las células residentes e infiltradas en el cerebro isquémico, comienzan a expresarse en la fase aguda del ictus isquémico varias moléculas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias así como sus receptores (Brouns y De Deyn, 2009; Vila y Chamorro, 1995; Vila et al., 2000). Dichas moléculas contribuyen al daño isquémico, al edema y a la muerte neuronal (ver revisión de Denes et al., 2010; Rothwell y Hopkins, 1995).

Daño celular irreversible: Finalmente, todos estos procesos incluidos en la cascada isquémica convergen en un daño celular irreversible. Entre los principales procesos de muerte tras isquemia destacan la necrosis celular y la apoptosis (Martin et al., 1998). El grado de isquemia, la madurez de la célula, la concentración intracelular de calcio así como el microambiente celular van a determinar el tipo de muerte neuronal. Además, la autofagia parece ser un tercer mecanismo de muerte celular tras daño isquémico (Smith et al., 2011).

Como comentamos con anterioridad, el daño isquémico produce de manera fulminante la muerte celular por necrosis en la región del *core*. Sin oxígeno ni glucosa, las neuronas no pueden generar el ATP necesario para mantener el

gradiente iónico a través de las membranas neuronales, principalmente mediante la Na^+/K^+ ATPasa. Debido a esto, una elevación masiva de Na^+ y Ca^{2+} en el citoplasma lleva a pérdida de turgencia y degeneración de los orgánulos, pérdida de la integridad de la membrana y la disolución de la célula (muerte por necrosis). En paralelo, parte de las células situadas en la región de peri-infarto o penumbra sufren un proceso de muerte celular programada o apoptosis. Este tipo de muerte permite a la células morir sin contribuir al proceso inflamatorio y sin la liberación de material genético (Choi, 1996).

Debido a la importancia que representa para esta Tesis, a continuación vamos a ahondar en el proceso de excitotoxicidad mediada a través de la sobreactivación de los receptores de NMDA por el exceso de glutamato, la subsecuente entrada de calcio a través de los mismos y las rutas intracelulares promovidas por la activación de los receptores NMDA.

1.5 GLUTAMATO: FUNCIÓN FISIOLÓGICA Y PATOLÓGICA

1.5.1 Fisiología del glutamato en el sistema nervioso central

El glutamato es uno de los principales neurotransmisores excitatorios del sistema nervioso central. Su nivel en el cerebro de los mamíferos es 1000 veces superior al de otros importantes neurotransmisores como la dopamina o serotonina. Este neurotransmisor es el responsable del control de funciones sinápticas y celulares y, se encuentra implicado en procesos de aprendizaje, memoria y capacidad motora (Greengard, 2001; Ozawa et al., 1998). Dada su importancia en el mantenimiento de la homeostasis y el funcionamiento del cerebro, no es de extrañar que, este neurotransmisor se encuentre implicado de manera directa o indirecta en diversas patologías que afectan al sistema nervioso central (Dong et al., 2009; Lo et al., 2003; Parameshwaran et al., 2008; Raymond et al., 2011). De hecho, el glutamato se encuentra regulado a

diferentes niveles que incluyen desde su síntesis hasta su posterior recaptación en la hendidura sináptica, en lo que comúnmente se denomina el ciclo del glutamato (**Figura 1.7**).

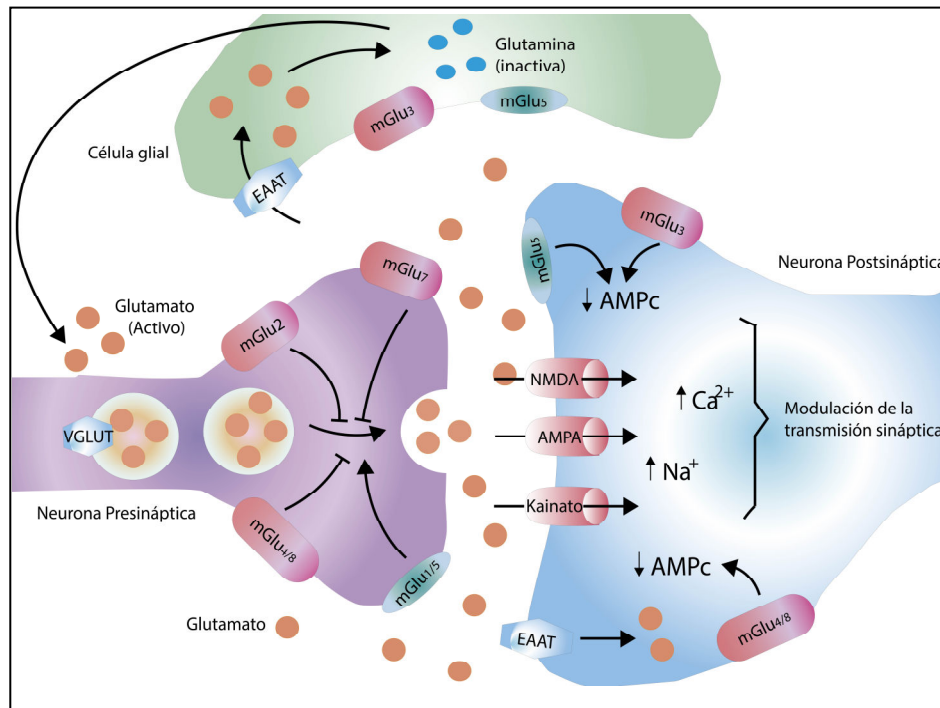


Figura 1.7. Ciclo del glutamato en condiciones fisiológicas (Swanson et al., 2005). La síntesis del glutamato tiene lugar en el citoplasma neuronal a partir de la glutamina procedente de las células gliales. En el citoplasma de la neurona presináptica, el glutamato, gracias a los transportadores vesiculares de glutamato VGLUTs, se almacena en vesículas sinápticas hasta su posterior liberación al espacio sináptico (Hinoi et al., 2005; Shigeri et al., 2004). Cuando se desencadena un potencial de acción en la neurona presináptica, la membrana se despolariza, incrementando el Ca^{2+} intracelular a través de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes, permitiendo la fusión de las vesículas a la membrana, y liberando el glutamato al espacio sináptico. Finalmente, una vez que el glutamato ha ejercido su acción a través de la unión a sus receptores glutamatérgicos de tipo ionotrópico y metabotrópico, se elimina de la sinapsis gracias a los denominados transportadores de aminoácidos excitatorios (EAATs) dependientes de Na^+ , situados en la membrana tanto de neuronas como de células de la glía, y que eliminan este neurotransmisor de la hendidura sináptica. El glutamato circula entre las células y el espacio sináptico a través del ciclo glutamato-glutamina. Así, el glutamato recaptado por las células gliales se metaboliza para convertirse en glutamina, que será de nuevo transportada a las neuronas donde será transformada otra vez en glutamato y éste a su vez será de nuevo empaquetado en las vesículas sinápticas por la acción de los VGLUTs (Hinoi et al., 2005; Mehta et al., 2013; Shigeri et al., 2004).

El glutamato ejerce sus acciones en la neurona postsináptica a través de dos tipos principales de receptores, los receptores de tipo ionotrópico y los

receptores de tipo metabotrópico (Mehta et al., 2013; Michaelis, 1998; Nicoletti et al., 2011; Niswender y Conn, 2010; Ozawa et al., 1998)

Los receptores de tipo ionotrópico se caracterizan por encontrarse acoplados a un canal iónico, y se encargan de la transmisión sináptica rápida. Los receptores ionotrópicos se encuentran agrupados en 3 subclases en base a su homología funcional y molecular y, se denominan en función de determinados agonistas exógenos que son selectivos para cada subtipo de receptor (Traynelis et al., 2010). En primer lugar, los *Receptores AMPA* (Amino-3-Hidroxi-5-Metil-4-Isoxazol-Propiónico) producen la despolarización de la neurona postsináptica mediante principalmente la entrada de Na^+ y, posteriormente y de manera secundaria, la entrada de Ca^{2+} . El segundo tipo son los *Receptores de Kainato*, que despolarizan la membrana postsináptica a través de la entrada de Na^+ . Y por último encontramos a los *Receptores NMDA* (N-Metil-D-Aspartato), que despolarizan la neurona postsináptica mediante principalmente la entrada de Ca^{2+} y, en menor medida, la entrada de Na^+ . Este tipo de receptores destaca por su alta permeabilidad al Ca^{2+} en comparación con los receptores AMPA y los receptores de Kainato (Planells-Cases et al., 2006; Stephenson, 2001; Traynelis et al., 2010).

El segundo tipo de receptores glutamatérgicos son los *receptores metabotrópicos o mGluR*. Estos receptores glutamatérgicos se encuentran acoplados a proteínas G, promoviendo la traducción de la señal intracelular a través de segundos mensajeros. El sistema de segundos mensajeros puede iniciar la producción de IP3 (Fosfadilinositol trifosfato) y la movilización del Ca^{2+} intracelular proveniente de los sitios de almacenamiento interno, o bien inhibir a la enzima adenilato ciclasa (Nicoletti et al., 2011; Niswender y Conn, 2010). Los receptores mGlu consisten en al menos 8 subtipos que se incluyen en tres subgrupos en función de su homología (revisado en Conn y Pin, 1997; Pellegrini-Giampietro, 2003). Situados tanto en la membrana de la neurona

presináptica como en la neurona postsináptica, esta familia de receptores proporciona un mecanismo intracelular por el cual su activación por glutamato es capaz de regular numerosas funciones neuronales y gliales que no son típicamente moduladas por los receptores glutamatérgicos acoplados a canales iónicos (revisado en Conn, 2003).

1.5.2 Excitotoxicidad mediada por el glutamato

Al mismo tiempo que el glutamato cobraba relevancia como neurotransmisor por su prevalencia en el SNC y su implicación en procesos de aprendizaje, plasticidad y memoria, Lucas y Newhouse (Lucas y Newhouse, 1957) demostraron que el glutamato podía actuar como una potente neurotoxina al observar que, la inyección sistémica de glutamato en ratones jóvenes producía una destrucción total de las capas neurales de la retina. Diez años después, los estudios realizados por el grupo de Olney corroboraron la toxicidad de altas dosis de glutamato a nivel del sistema nervioso central (Olney, 1969; Olney y de Gubareff, 1978). Estas observaciones llevaron a la introducción del término *excitotoxicidad*, para referirse al proceso de toxicidad y neurodegeneración que producían altas concentraciones de aminoácidos de tipo excitatorio como el glutamato (Olney y de Gubareff, 1978).

Durante un ictus isquémico, a consecuencia de la disminución total o parcial del flujo sanguíneo en el cerebro, los niveles de oxígeno y glucosa se reducen hasta tal punto que conducen de manera inevitable a un déficit energético. La ausencia de ATP colapsa el funcionamiento de la bomba Na^+/K^+ ATPasa (Katsura et al., 1994). Como consecuencia, la exquisita regulación del balance iónico se pierde, promoviendo la elevación de Na^+ en el citoplasma y de K^+ en el exterior (Choi, 1987, 1988a).

Estos procesos facilitan la despolarización masiva de las membranas neuronales, incrementando la concentración de Ca^{2+} en el interior y permitiendo la fusión de las vesículas cargadas de glutamato a la hendidura sináptica.

La excesiva liberación de glutamato al espacio sináptico y la ausencia de recaptación del mismo (Choi, 1988a, b) producen una sobre-activación de los diferentes receptores glutamatérgicos en las neuronas postsinápticas (Tymianski, 1996; Tymianski y Tator, 1996), ocasionando una entrada masiva de Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- y Zn^{2+} principalmente (Choi, 1988a; Frederickson et al., 2004; Shuttleworth y Weiss, 2011), que se traduce en cambios iónicos intracelulares en la neurona postsináptica que tendrán devastadoras consecuencias en el funcionamiento de la misma.

Esta activación intensa, prolongada y sostenida de los receptores glutamatérgicos por el exceso de glutamato extracelular, la consiguiente entrada masiva de iones al interior celular y, finalmente, la muerte desencadenada por estos procesos, es lo que se conoce con el término de *excitotoxicidad mediada por glutamato*.

Como hemos comentado previamente, la sobreactivación de los receptores glutamatérgicos potencia la entrada masiva y la elevación en el interior celular de Ca^{2+} , Na^+ y Zn^{2+} que van a contribuir de diferentes formas al daño excitotóxico. De entre estos, sin duda el más relevante es *la entrada y la elevación masiva de Ca^{2+} al interior celular* (ver Figura 1.8) (Simon et al., 1984). Esta entrada masiva de Ca^{2+} al interior celular se va a producir de manera mayoritaria a través de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos y, en especial, a través de los receptores NMDA (Kroemer et al., 2007; Michaelis, 1998). Su alta permeabilidad al Ca^{2+} en comparación con la de los receptores AMPA y los de Kainato (Planells-Cases et al., 2006) los convierte en los principales responsables del incremento del Ca^{2+} intracelular y, por tanto, en los

principales mediadores de la excitotoxicidad mediada por el glutamato tras el proceso isquémico.

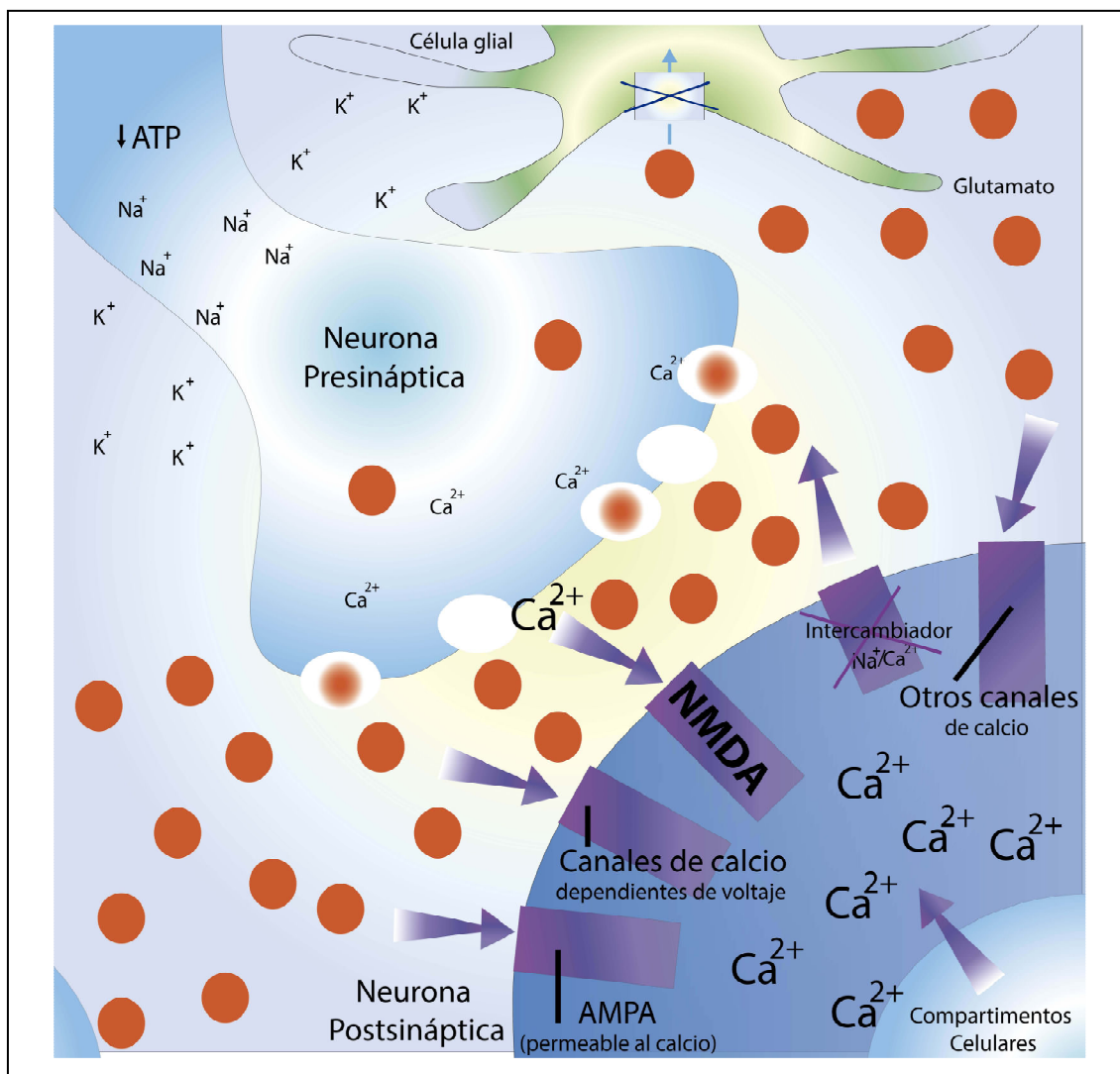


Figura 1.8. Entrada y elevación de Ca^{2+} en el interior neuronal como consecuencia del proceso de excitotoxicidad mediada por glutamato en la isquemia cerebral. El déficit de ATP en la neurona presináptica colapsa el funcionamiento de la bomba Na^+/K^+ ATPasa (Katsura et al., 1994) produciendo la pérdida del balance iónico neuronal (Choi, 1987, 1988a). Como consecuencia, se produce una despolarización masiva de la membrana y el subsiguiente incremento intracelular de Ca^{2+} promueve la fusión de las vesículas cargadas de glutamato y la liberación de éste a la hendidura sináptica. Este hecho, sumado al fallo de los transportadores de glutamato en las células gliales, contribuye a la elevación excesiva de este neurotransmisor en el espacio extracelular. En el exterior, la excesiva acumulación de glutamato producirá una sobreactivación de los receptores NMDA situados en la membrana postsináptica mediando la entrada y elevación de Ca^{2+} en el interior celular. Otras rutas de entrada de Ca^{2+} como los receptores AMPA, los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, los canales sensibles al ácido, la proteólisis del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e incluso la liberación de Ca^{2+} procedente de los compartimentos celulares, también contribuyen de manera activa a la elevación de Ca^{2+} en la neurona (Esquema adaptado de la revisión de Choi, 2005).

Además de la entrada principal de Ca^{2+} mediada por los receptores NMDA, existen otras vías que participan de manera activa en la entrada y elevación de este catión en el interior de la neurona postsináptica (Revisado en Szydlowska y Tymianski, 2010).

Concretamente, la entrada inicial de Ca^{2+} al interior puede provenir de manera indirecta de canales iónicos y transportadores permeables al Ca^{2+} presentes en la membrana neuronal. Algunos ejemplos son los canales TRP (receptores de potencial transitorio) (Nicotera y Bano, 2003; Sun et al., 2009), los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (Pignataro et al., 2004), los canales iónicos sensibles al ácido (ASICs) (Xiong et al., 2004) y, posiblemente, la fragmentación de los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Además, se potencia la liberación del Ca^{2+} desde determinados compartimentos intracelulares como la mitocondria (Gunter y Pfeiffer, 1990; Loew et al., 1994) y el retículo endoplasmático (Paschen y Doutheil, 1999).

El resultado final, en definitiva, es una acumulación excesiva de Ca^{2+} en el interior de la neurona postsináptica que ocasionará de manera directa o indirecta la muerte de la misma (Orrenius et al., 2003).

Tal y como se observa en la **Figura 1.9**, la plétora de efectos ocasionados por la elevación excesiva de Ca^{2+} son múltiples y actúan a distintos niveles (Dong et al., 2009). De entre estos, destacan la activación de enzimas dependientes de Ca^{2+} , como proteasas, fosfolipasas y nucleasas, cuya sobreactivación degradará diferentes estructuras celulares necesarias para el correcto funcionamiento neuronal (Mattson et al., 2000a; 2000b), el incremento en la producción de EROs y ERNs (Higuchi et al., 2005) y la disfunción mitocondrial (Mattson et al., 2000b). Todos estos mecanismos finalmente convergen en un daño celular irreversible, que finalizará con la muerte neuronal mediante procesos de necrosis así como de apoptosis.

Ya que como hemos comentado, de manera principal, los receptores NMDA son los responsables de la entrada de Ca^{2+} y de su elevación en el interior celular, en los siguientes apartados ahondaremos en su fisiología y función por la relevancia que presentan para esta Tesis doctoral.

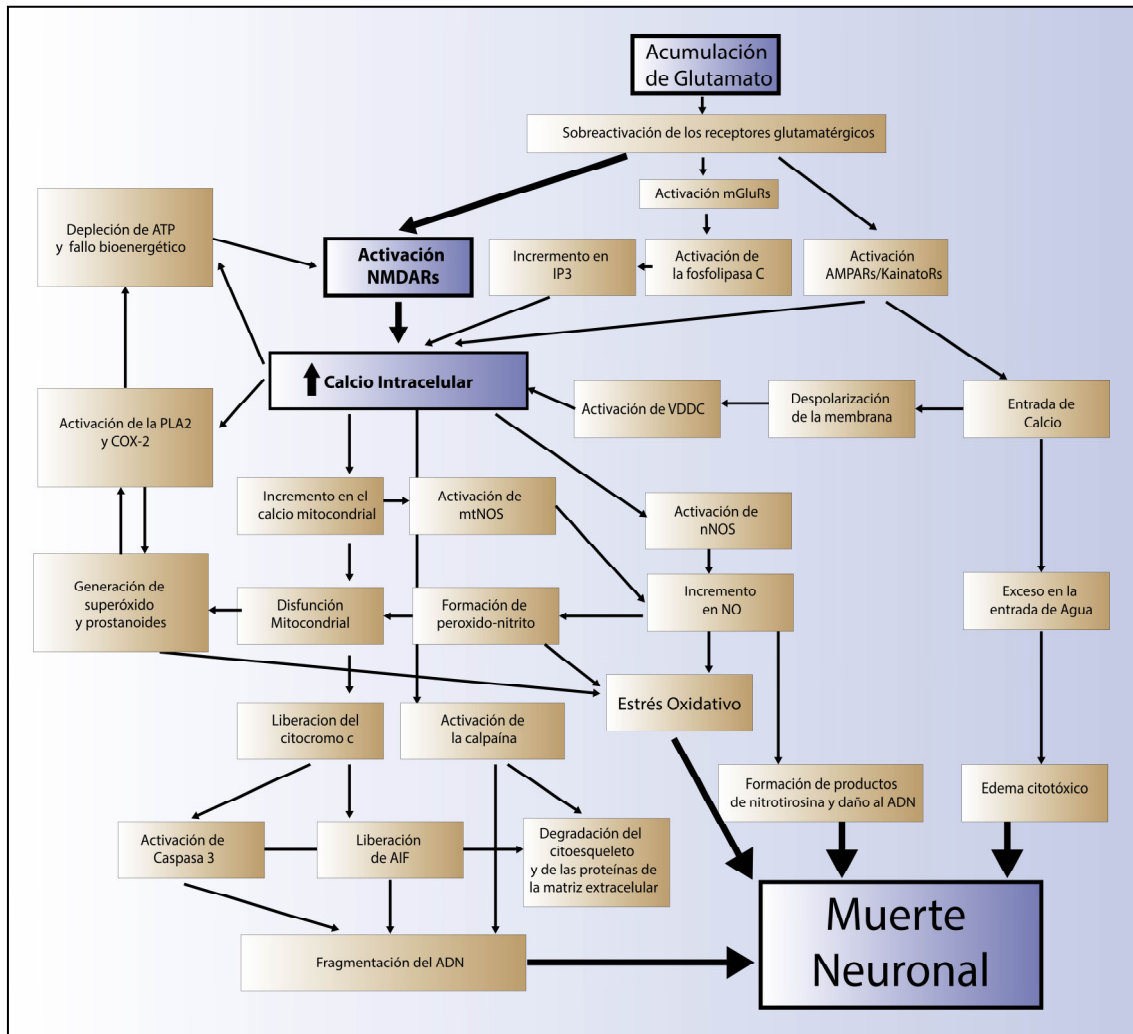


Figura 1.9. Principales mecanismos implicados en la excitotoxicidad mediada por glutamato tras la isquemia y consecuencias de la entrada y elevación de Ca^{2+} en el interior neuronal a través de los receptores NMDA. El punto de partida lo marca la elevación excesiva de glutamato en el espacio extracelular. A consecuencia, se produce una sobreactivación de los receptores glutamatérgicos que va a promover la entrada de Ca^{2+} al interior celular. Esta entrada se produce de manera principal a través de los receptores NMDA (y en menor medida el resto de receptores glutamatérgicos), lo que conlleva un incremento del Ca^{2+} . Este incremento provocará múltiples cambios como por ejemplo la activación de enzimas dependientes de Ca^{2+} que participarán en la degradación de los orgánulos celulares. Todos los procesos desencadenados por la elevación del Ca^{2+} finalmente convergen en la muerte de la neurona (Esquema adaptado a partir de las revisiones de Kostandy, 2012; Schorge y Colquhoun, 2003).

1.5.3 El Receptor ionotrópico NMDA

1.5.3.1 Perspectiva actual sobre el receptor NMDA como diana para la neuroprotección

Los receptores NMDA constituyen el principal subtipo de receptores de glutamato. En condiciones fisiológicas, este tipo de receptores ionotrópicos, al ser activados por el glutamato, median la transmisión sináptica excitatoria lenta y son cruciales en procesos de plasticidad sináptica y funciones como el aprendizaje o la memoria (Ozawa et al., 1998). Por el contrario, tal y como comentamos previamente, la sobreactivación de los receptores NMDA por el exceso de glutamato liberado tras la isquemia cerebral, y las consecuencias derivadas de esta sobreactivación, juegan un papel fundamental en los fenómenos de excitotoxicidad asociados a esta patología (Aarts et al., 2002; Choi, 1987; Kostandy, 2012; Liu et al., 2007; Martin et al., 1998; Mishizen-Eberz et al., 2004; Zhou et al., 2010). Como consecuencia, y apoyados por las evidencias obtenidas en estudios de tipo experimental (Aarts et al., 2002; Chen et al., 2008; Choi et al., 1988; Ikonomidou y Turski, 2002; Liu et al., 2007; Madden, 2002b; Martin et al., 1998; Muir y Lees, 2003; Muir, 2006), se han utilizado numerosos compuestos en ensayos clínicos enfocados a antagonizar la acción de los receptores NMDA tras el ictus (**Tabla 1.2**). Desgraciadamente, los resultados obtenidos hasta la fecha son desalentadores y decepcionantes. Los compuestos utilizados en estos ensayos, destinados a inhibir la acción de los receptores NMDA, no solo presentaron una pobre tolerancia y eficacia neuroprotectora, sino que además, producían numerosos efectos adversos en el SNC (este tema ha sido revisado en Ikonomidou y Turski, 2002; Muir y Lees, 2003; Muir, 2006). Las razones para el fracaso de los ensayos clínicos con antagonistas de los receptores NMDA han sido múltiples y, en parte, como comentamos previamente en la parte de la Introducción enfocada a las terapias neuroprotectoras (**Tabla 1.1**), la ausencia de homogeneidad entre los estudios

de tipo básico y clínico, y un mal diseño experimental, han sido críticos para el fracaso de la traslacionalidad.

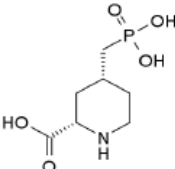
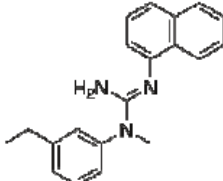
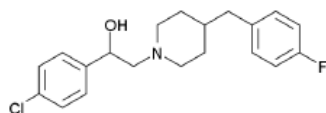
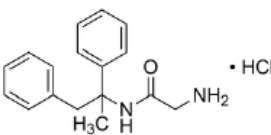
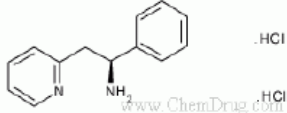
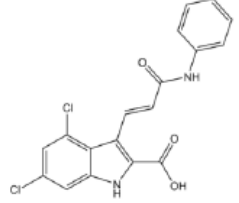
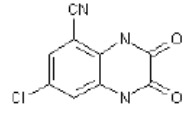
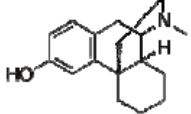
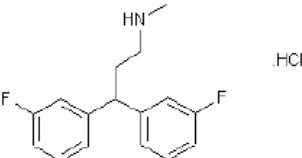
Compuesto	Estructura	Acción
Selfotel (CGS 19755)		<i>Antagonista competitivo</i> del receptor NMDA que actúa en el sitio de unión del glutamato
Clorhidrato de Aptiganel (CNS 1102)		<i>Antagonista no competitivo</i> del NMDA con alta afinidad por el sitio del canal iónico.
Eliprodil		El eliprodil y su compuesto relacionado ifenprodil se unen al sitio modulador de poliaminas en el receptor NMDA, siendo <i>ligandos específicos</i> de la subunidad NR2B.
Clorhidrato de Remacemida		Este compuesto bloquea los canales de sodio voltaje dependientes. Además, es metabolizado en un compuesto que antagoniza de manera <i>no competitiva</i> al receptor NMDA.
AR-R15896AR		<i>Antagonista no competitivo</i> de baja afinidad que presenta además afinidad por el receptor Sigma1.
Gavestinel (GV150526A)		<i>Antagonista competitivo</i> en el sitio de unión a la glicina.
Licostinel (ACEA 1021)		<i>Antagonista competitivo</i> en el sitio de unión a la glicina.
Dextrorfan		<i>Antagonista no competitivo</i> de los receptores NMDA en el sitio del canal. Además, antagoniza la acción de canales de calcio dependientes de voltaje.
NPS-1506		Antagonista no competitivo de los receptores NMDA

Tabla 1.2. Antagonistas de los receptores NMDA utilizados en diferentes ensayos clínicos para el tratamiento del ictus isquémico (Tabla adaptada a partir de Ikonomidou y Turski, 2002; Muir, 2006; Muir y Lees, 2003).

Pero además, en este caso concreto, nos enfrentamos con un problema añadido al bloquear al receptor NMDA como terapia neuroprotectora para el ictus isquémico, así como para otras patologías del SNC: *el papel crucial de este receptor a nivel fisiológico* (ver revisión de Hardingham, 2006; Pohl et al., 1999). ¿Qué ocurre si bloqueamos no solo las señales del receptor implicadas en el proceso de excitotoxicidad, sino si también eliminamos aquellas que participan en la transmisión sináptica normal, en los procesos de aprendizaje, memoria y plasticidad sináptica? Es evidente que las consecuencias son devastadoras a corto y largo plazo. Por tanto, para considerar al receptor NMDA como una diana terapéutica en el tratamiento del ictus isquémico y de otro tipo de enfermedades neurodegenerativas que cursan con alteraciones glutamatergicas, necesitamos ser capaces de discriminar entre los receptores NMDA y/o las señales intracelulares promovidas por los mismos que conllevan de manera irreversible a la muerte neuronal y aquellas señales y/o receptores que potencian la supervivencia y participan en procesos de plasticidad y transmisión sináptica, sin los cuales la neurona se vería abocada a un proceso de destrucción.

Ahondar en los procesos de regulación de este tipo de receptores y esclarecer qué mecanismos determinan la capacidad del receptor para promover o frenar la muerte neuronal, permitiría el diseño de terapias enfocadas a un bloqueo selectivo de las señales asociadas a la muerte, sin afectar y/o potenciando aquellas señales implicadas en rutas de supervivencia neuronal y plasticidad sináptica (Hardingham y Bading, 2010).

Como veremos en detalle a continuación, gracias a la extensa investigación focalizada en la biología, la organización y el funcionamiento de los receptores NMDA, se sabe que este tipo de receptores ionotrópicos está sometido a un estricto proceso de regulación en donde factores como el tráfico, la inserción y la estabilización de los receptores en la membrana, su posición en los sitios

sinápticos vs. los sitios extrasinápticos, la composición mediante las subunidades NR2A y/o NR2B, la interacción por su dominio citoplasmático con complejos intracelulares como las MAGUKs (guanilato quinasa asociadas a membrana), así como modificaciones de tipo post-traduccionales, van a determinar el funcionamiento del receptor y su contribución a los procesos de muerte y supervivencia neuronal (Chen et al., 2008; Guttman et al., 2001; Hetman y Kharebava, 2006; Liu et al., 2007; Tu et al., 2010; Zhou et al., 2010).

En los siguientes apartados intentaremos explicar de qué manera estos procesos participan en la regulación de la actividad del receptor y de su acción, y tal y como se muestra en la **Figura 1.10**, cómo tras un ictus isquémico, el funcionamiento defectivo y/o la alteración de estos procesos, contribuyen a los efectos deletéreos mediados por el receptor NMDA tras la isquemia cerebral.

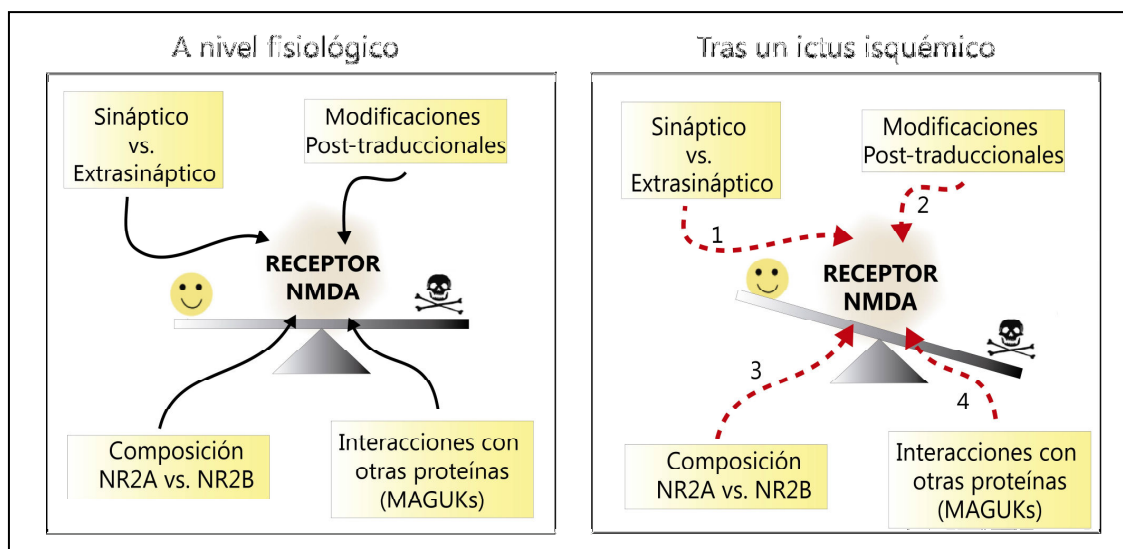


Figura 1.10. Regulación del receptor NMDA a nivel fisiológico y tras un ictus isquémico. Los receptores NMDA están sometidos a un estricto proceso de regulación fisiológico con el fin de mantener el correcto funcionamiento del receptor. Algunos ejemplos son los mostrados en la imagen (panel izquierdo). Tras un ictus, estos procesos reguladores se alteran, hecho que repercute de manera directa en el receptor, modificando su acción fisiológica y participando en los efectos deletéreos dependientes del receptor NMDA. Algunos ejemplos detectados en estos mecanismos de regulación tras la isquemia cerebral se citan a continuación y serán vistos en detalle en el apartado correspondiente: 1) Localización sináptica vs. extrasináptica (Tu et al., 2010; Vizi et al., 2013); 2) Modificaciones post-traduccionales (Guttman et al., 2001; Guttman et al., 2002; Zhang et al., 2013a); 3) Composición NR2A vs. NR2B (Chen et al., 2008; Liu et al., 2007; Terasaki et al., 2010); 4) Interacciones con otras proteínas (MAGUKs) (Aarts et al., 2002; Cook et al., 2012; Cui et al., 2007; Yuen et al., 2008; Zhou et al., 2010).

1.5.3.2 Estructura y activación del receptor NMDA

Los receptores NMDA son complejos proteicos de tipo tetramérico o pentamérico compuestos por la combinación de diferentes subunidades denominadas NR1, NR2 y NR3 (Chatterton et al., 2002). Los receptores NMDA funcionales se encuentran constituidos por dos subunidades obligatorias de tipo NR1, y una o más subunidades reguladoras de tipo NR2 y de tipo NR3 (Madden, 2002a; 2002b). Estas subunidades se organizan en la membrana alrededor de una cavidad central conformando un canal iónico que presenta como característica fundamental una alta permeabilidad al Ca^{2+} .

Las diferentes subunidades que conforman el receptor NMDA presentan una estructura molecular conservada (**Figura 1.11**)

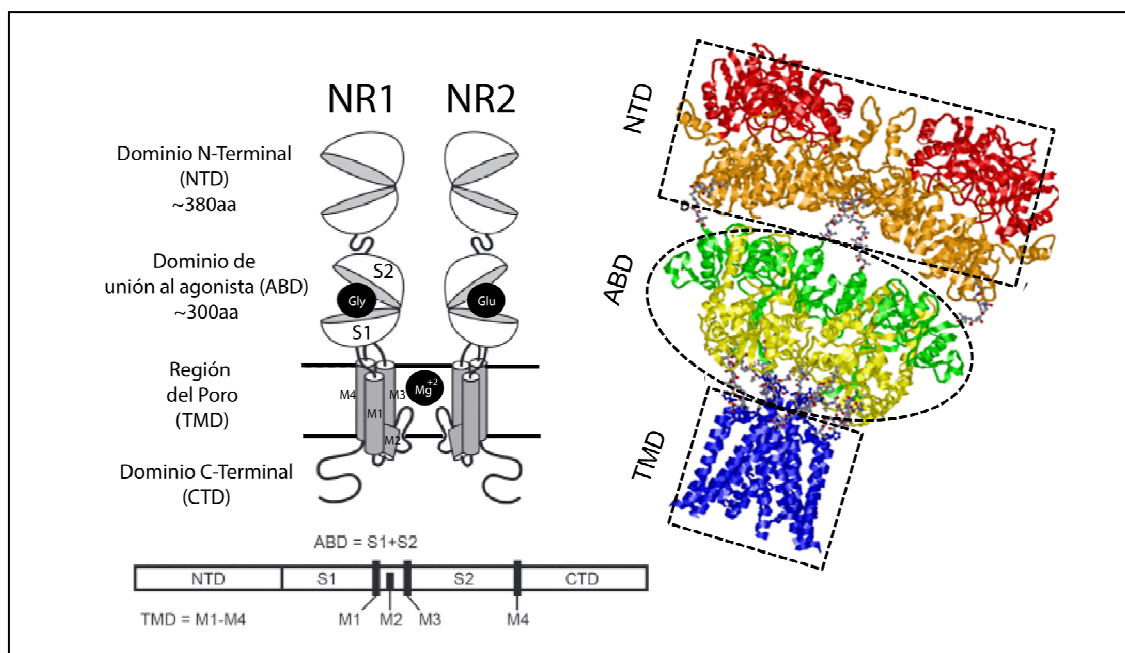


Figura 1.11. Estructura del receptor NMDA. Representación esquemática de la estructura de los receptores NMDA en donde se aprecian la topología común y los principales dominios que conforman cada una de las subunidades del receptor. En el panel de la derecha se observa la estructura cuaternaria del complejo NR1/NR2A (Esquemas adaptados a partir de Gielen et al., 2009; Paoletti y Neyton, 2007).

El receptor se divide en 4 dominios funcionales: Un dominio extracelular N-terminal (NTD), un dominio de unión al ligando (LBD), una región transmembrana constituida por 4 segmentos hidrofóbicos (M1-M4) en donde el

segmento M2 de cada subunidad se encuentra embebido en la bicapa para formar el canal, y por último, un dominio C-terminal (CTD) que se sitúa en la región intracelular. Además, cada una de las subunidades de tipo NR1 y NR2 que conforman el receptor presenta en su dominio de unión al ligando los bucles de tipo S1 y S2. Estos bucles permiten la unión de los co-agonistas glicina/D-serina y glutamato al receptor (Schorge y Colquhoun, 2003)

En comparación con el resto de receptores ionotrópicos, el receptor NMDA destaca por una serie de características funcionales, entre las que se incluyen su alta permeabilidad al Ca^{2+} , una cinética de activación/desactivación lenta y su también elevada permeabilidad para iones monovalentes como el Na^+ y K^+ (Ichinose et al., 2003). Además, la activación de este receptor es un proceso complejo que lo convierte en un receptor único. Cuando el potencial de membrana está en reposo, el poro del canal del receptor se encuentra bloqueado por los niveles fisiológicos de Mg^{2+} . Este bloqueo es dependiente de voltaje y la salida del Mg^{2+} solo se produce si de manera simultánea se estimula la neurona presináptica y postsináptica. Por tanto, la activación del NMDAR requiere de la despolarización de la membrana postsináptica (que media la liberación del Mg^{2+}) y, al mismo tiempo, la liberación presináptica del glutamato y su interacción con la subunidad NR2. Además, es necesario que se produzca un tercer evento para la activación del receptor NMDA: la presencia de glicina o D-serina ocupando el sitio de unión al ligando en la subunidad NR1 (Krupp et al., 1999).

1.5.3.3 Regulación del receptor NMDA

En este apartado describiremos con detalle los procesos de regulación que afectan al receptor NMDA, esquematizados en la **Figura 1.10** y que incluyen, la localización del receptor, su composición, su interacción con las proteínas MAGUK y las modificaciones post-traduccionales a las que está sometido.

A. Localización del receptor: Receptores NMDA sinápticos vs. NMDA extrasinápticos

Clásicamente, podríamos decir que los receptores NMDA se encuentran localizados en la sinapsis y, más concretamente, en la denominada densidad postsináptica (PSD). Esta estructura es una región de alta densidad situada en la membrana postsináptica, que está constituida, como veremos en más detalle posteriormente, por complejos proteicos que incluyen proteínas de anclaje y de señalización entre las que principalmente destacan las proteínas MAGUKs (ver revisión de Petralia, 2012). Sin embargo, los receptores NMDA también pueden situarse en otros muchos lugares de la membrana neuronal. A estos receptores NMDA que se localizan fuera de la zona activa de la sinapsis se les conoce como receptores *NMDA extrasinápticos*, para diferenciarlos de los denominados receptores *NMDA sinápticos* situados en la sinapsis (Harris y Pettit, 2007; Léveillé et al., 2008).

Está claro que la localización de los receptores no es un proceso al azar. O bien cumplen una función necesaria determinada por su posición que los diferencia de la llevada a cabo por los receptores NMDA sinápticos, o bien son simplemente sitios de tránsito de los receptores sinápticos en movimiento para ser endocitados o exocitados (Sans et al., 2003; 2005).

Sea cual sea el motivo para su diferente localización, lo que ha quedado claramente demostrado a lo largo de numerosos estudios es que la activación de los receptores sinápticos vs. los extrasinápticos desencadena diferentes mecanismos de señalización que tienen como resultado la supervivencia y la muerte neuronal, respectivamente (Dick y Bading, 2010; Hardingham y Bading, 2002; Hardingham et al., 2002; Harris y Pettit, 2007; Léveillé et al., 2008; Léveillé et al., 2010; Papadia et al., 2008; Tu et al., 2010; Xu et al., 2009; Zhang et al., 2007).

Uno de los pioneros en este campo, el Dr. Hardingham, ha denominado a este hecho la *“paradoja de los receptores NMDA”* (Al-Mubarak et al., 2009; Hardingham, 2006; Hardingham y Bading, 2002, 2010; Léveillé et al., 2010; Martel et al., 2009; Papadia et al., 2005; 2008), según la cual, la localización de los receptores NMDA en la membrana determina que se encuentren acoplados a rutas que promuevan la supervivencia o la muerte de las neuronas. En base a esto, el destino de la neurona no solo está determinado por el grado de activación del receptor NMDA, sino también por el grado en el que los receptores sinápticos y extrasinápticos se encuentren activados. De acuerdo con este nuevo modelo, la entrada de Ca^{2+} a través de los receptores sinápticos promovería la supervivencia neuronal, mientras que la sobrecarga de Ca^{2+} producida por la entrada a través de los receptores NMDA extrasinápticos resultaría dañina para la neurona. Tal y como se observa en la **Figura 1.12**, la activación de los receptores seguiría un *modelo en forma de X*, en donde la activación excesiva de los receptores extrasinápticos, o la hipofunción de los receptores sinápticos, resultaría dañina para la neurona.

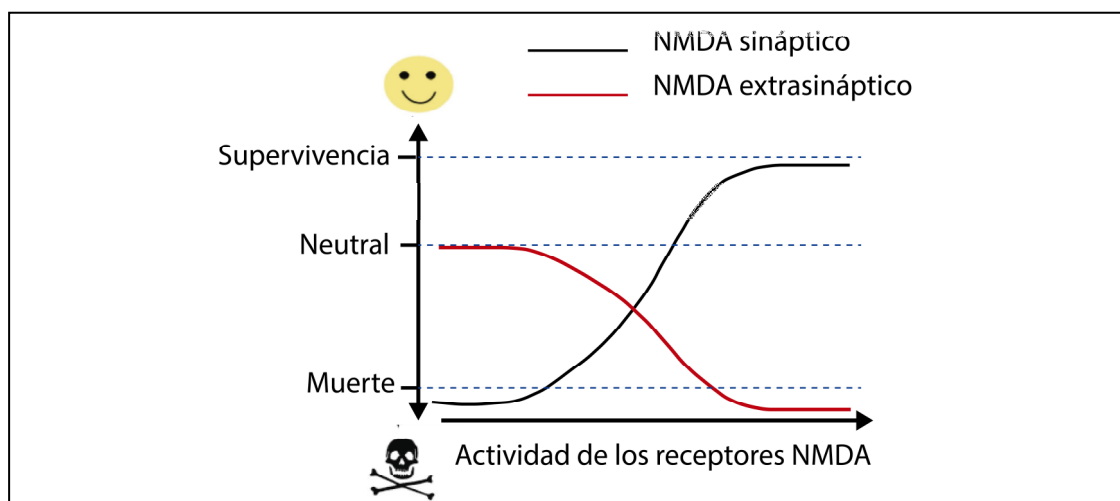


Figura 1.12. Modelo en forma de X de la excitotoxicidad dependiente del funcionamiento de los receptores NMDA. Efectos contrapuestos del incremento de actividad de los receptores NMDA sinápticos y extrasinápticos. Potenciando los receptores sinápticos se activan rutas de neuroprotección que llevan a la supervivencia neuronal. Bajos niveles de activación de los receptores extrasinápticos no tienen efecto en la supervivencia, pero incrementando el nivel de activación extrasináptica se reduce la supervivencia neuronal. La hipofunción de los receptores sinápticos también resultaría catastrófica para la supervivencia neuronal (Adaptada de Hardingham, 2002; 2006; Hardingham y Bading, 2010).

Si nos centramos en los procesos desencadenados por ambos tipos de receptores, podemos observar cómo parecen actuar de manera antagónica (ver revisiones de Hardingham, 2006, 2009; Hardingham y Bading, 2010) (**Figura 1.13 y Figura 1.14**).

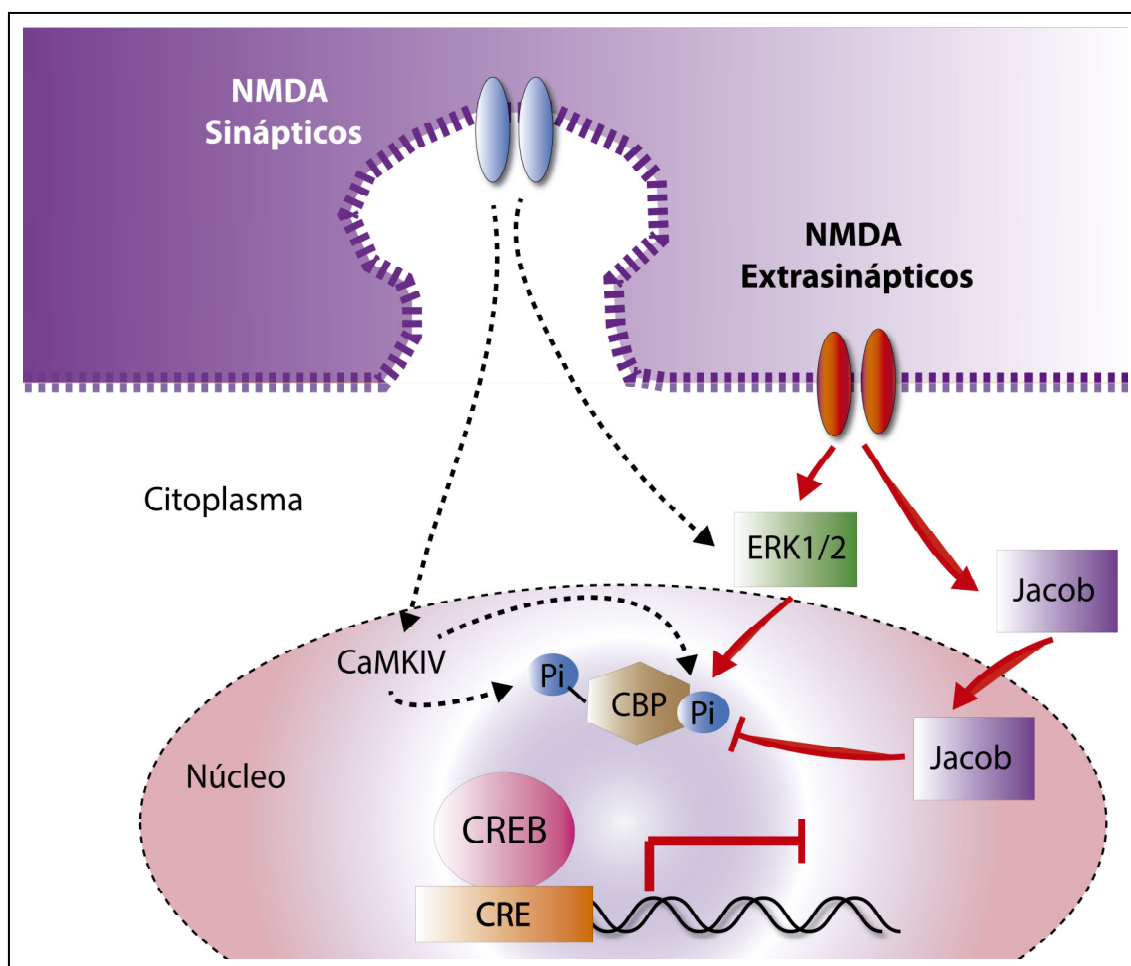


Figura 1.13. Efectos opuestos sobre CREB por la activación de los receptores NMDA sinápticos y extrasinápticos. Ante la activación simultánea de los receptores NMDA sinápticos y extrasinápticos, la ruta promovida por los receptores NMDA extrasinápticos actúa como ruta dominante (marcado mediante flechas en rojo), inhibiendo a distintos niveles la actividad génica mediada por el factor de transcripción CREB (Hardingham, 2009; Hardingham y Bading, 2010).

Como podemos observar en la **Figura 1.13**, la entrada de Ca^{2+} en el citoplasma a través de los receptores NMDA sinápticos va a producir la activación de la ruta Ras/ERK (Quinasa activada por señales extracelulares) en el citoplasma y de la proteína quinasa calmodulina dependiente de Ca^{2+} (principalmente CaMKIV) en el núcleo (Chandler et al., 2001; Papadia et al., 2005). Estas dos quinasas, una

vez activas, median la fosforilación del factor de transcripción CREB (Proteína de unión al elemento de respuesta del AMP cíclico) en el residuo de serina 133, permitiendo a CREB reclutar a su principal co-activador, CBP (Proteína de unión a CREB) (Chrivia et al., 1993; Kwok et al., 1994). Una vez activo, CREB promueve la transcripción de los denominados genes *AID* (Inhibidores de muerte regulados por actividad) (Lau y Bading, 2009; Léveillé et al., 2010; Zhang et al., 2007; 2009), los cuales son neuroprotectores en modelos de excitotoxicidad y neurodegeneración *in vivo* e *in vitro* (Zhang et al., 2009). Además, dentro de las dianas de CREB, la más destacada es la neurotrofina BDNF (Factor neurotrófico derivado del cerebro) (Favaron et al., 1993; Hardingham et al., 2002; Zhang et al., 2007), cuya expresión se correlaciona de manera directa con la supervivencia neuronal (Hansen et al., 2004; Thoenen et al., 1987). Por el contrario, los receptores NMDA extrasinápticos se encuentran acoplados a una vía de señalización dominante que produce la desfosforilación de CREB a través de la proteína nuclear Jacob (Bading et al., 1993; Hardingham et al., 2002), o a través de la desfosforilación de ERK inhibiendo por tanto la actividad transcripcional de CREB (Chandler et al., 2001; Kim et al., 2005) **(Figura 1.13).**

Además, el efecto antagónico de la activación de ambos receptores se observa también en la vía de apoptosis, a través de la modulación directa de proteínas implicadas en esta ruta, como por ejemplo, Puma, Apaf-1 y las caspasas, o bien, a través de la modulación de factores de transcripción como FOXO (*Forkhead Box O*) (Al-Mubarak et al., 2009) y p53 (Lau y Zukin, 2007) **(Figura 1.14).**

B. Composición del receptor por diferentes subunidades: NR2A vs. NR2B

Como comentamos previamente, el receptor NMDA está formado por la combinación de las subunidades NR1, NR2 y NR3. Mientras que la subunidad NR1, subunidad obligatoria del receptor, existe como una única isoforma, se ha

descrito la existencia de 4 isoformas para la subunidad NR2, denominadas NR2A, NR2B, NR2C y NR2D, y 3 isoformas diferentes para la subunidad NR3, NR3A-C (Llansola et al., 2005; Madden, 2002a).

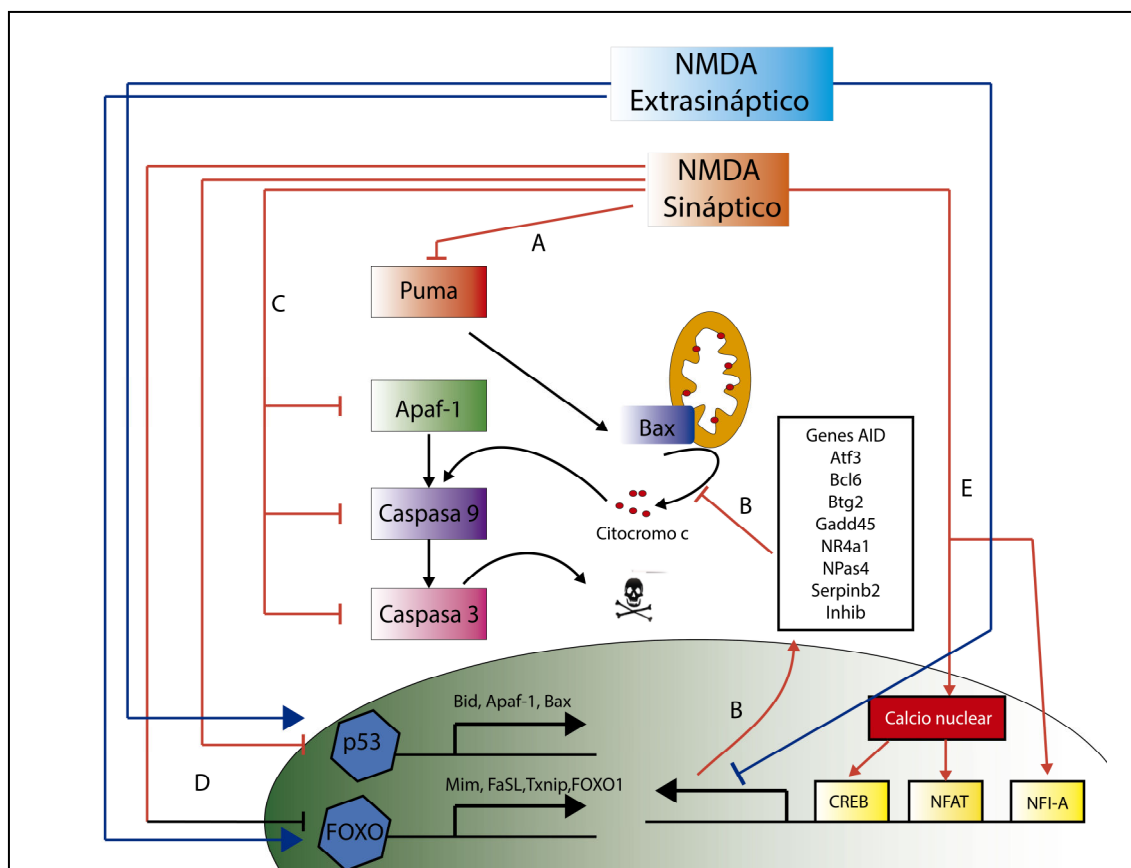


Figura 1.14. La señalización a través de los receptores NMDA sinápticos suprime la vía intrínseca de apoptosis en múltiples niveles. La supresión transcripcional de Puma (Modulador de la apoptosis regulado por p53) evita la salida del citocromo c de la mitocondria (A). La expresión de la batería de genes dependientes de Ca^{2+} promueve neuroprotección; además inhibe la despolarización de la membrana mitocondrial y la salida del citocromo c (B). La inhibición transcripcional de componentes de la ruta de las caspasas como Noxa, Bim (Proteína activadora de tipo BH3), Puma, Apaf-1 (Proteasa activadora del factor apoptótico-1) y la procaspasa 9 (Dick y Bading, 2010; Papadia et al., 2005) disminuye el proceso apoptótico (C). Además, la actividad sináptica de los receptores NMDA promueve la supresión de FOXO y p53, con la consiguiente supresión de los genes que regulan (Al-Mubarak et al., 2009; Lau y Zukin, 2007) (D). Finalmente, se muestran los factores de transcripción que se ha demostrado son importantes para la señal intracelular tras la activación sináptica de los NMDA, CREB, NFAT y NFI-A (E) (Esquema adaptado de Hardingham, 2009; Hardingham y Bading, 2010).

Pese al grado de conservación estructural de las subunidades (Figura 1.11), todas ellas difieren de manera drástica en sus patrones de expresión a lo largo

del desarrollo y, a nivel regional en el adulto, en su localización a nivel de la membrana neuronal y, por supuesto, difieren en sus características funcionales (Sanz-Clemente et al., 2013).

La subunidad esencial del receptor NMDA, la subunidad NR1, se expresa de manera ubicua en el SNC (Laurie y Seeburg, 1994; Monyer et al., 1994); sin embargo, las isoformas de la subunidad NR2 se diferencian en su grado de expresión, siendo NR2A y NR2B las subunidades mayoritarias en los receptores funcionales del SNC (Madden, 2002a; Sprengel et al., 1998), encontrándose por tanto receptores compuestos por NR1/NR2A, NR1/NR2B y NR1/NR2A/NR2B. Aunque en el adulto ambas subunidades se expresan de manera abundante y similar en el cerebro, localizándose preferentemente en la corteza y el hipocampo (Stephenson, 2001), durante el desarrollo embrionario muestran una contribución diferencial y un patrón temporal concreto. Durante los estadios prenatales, los receptores de tipo NR1/NR2B constituyen la forma mayoritaria en el cerebro, sin embargo, al madurar la sinapsis, durante la segunda semana del desarrollo postnatal, se produce un cambio en la composición del receptor, incrementando drásticamente los constituidos por la subunidad NR2A (Monyer et al., 1994; Watanabe et al., 1993; Williams et al., 1993). Este mecanismo está conservado a lo largo de la evolución, y aunque el momento exacto en el que se produce el cambio de un tipo de receptor a otro depende de cada región, en general coincide con un incremento en la memoria asociativa, sugiriendo que este proceso juega un papel fundamental para el establecimiento de los circuitos neuronales.

A nivel funcional, como vemos en la **Tabla 1.3** donde se muestran las principales diferencias observadas entre estas subunidades, los receptores compuestos por subunidades NR2A presentan una cinética más rápida, una mayor probabilidad de apertura del canal así como un menor tiempo de desactivación que los compuestos por la subunidad NR2B. Una diferencia que

llama la atención es la mayor afinidad de los receptores NR2B por el glutamato en comparación con los receptores de tipo NR2A. Sin embargo, este hecho contrasta con lo observado al producirse una liberación de glutamato en la sinapsis: los receptores compuestos por subunidades NR2A presentan un mayor grado de activación que los compuestos por las de tipo NR2B.

Característica	NR2A	NR2B	Referencias
Cinética de activación	Rápida	Lenta	Gray et al., 2011; Vicini et al., 1998
Probabilidad de apertura	Alta	Baja	Erreger et al., 2005
Tiempo de desactivación	Rápido	Lento	Vicini et al., 1998
Afinidad por el glutamato	Menor afinidad	Mayor afinidad	Kew et al., 1998; Thomas et al., 2006
Expresión en el adulto	Ubicua en SNC	Encéfalo	Monyer et al., 1994
Localización neuronal	Principalmente Sináptica	Sináptica y Extrasináptica	Groc et al., 2009; Groc y Choquet, 2009
Expresión en la membrana	Estable	Dinámica	Groc et al., 2006
Mecanismo de endocitosis	Endosomas tardíos	Endosomas reciclados	Prybylowski et al., 2005

Tabla 1.3. Comparación de las principales características de los receptores compuestos por subunidades de tipo NR2A y de tipo NR2B.

La explicación para esta contradicción parece residir en parte, en la diferente localización de los receptores a nivel de la membrana neuronal. Mientras que los receptores compuestos por subunidades de tipo NR2A se localizan preferentemente, aunque no exclusivamente en los sitios sinápticos, los receptores compuestos por subunidades NR2B tienden a situarse en los sitios extrasinápticos (Bard y Groc, 2011; Groc et al., 2006; 2009; Groc y Choquet, 2009). Esta localización preferencial, junto con los diferentes efectos promovidos por la activación de los receptores NMDA sinápticos y extrasinápticos, tiende a asociar a los receptores compuestos por subunidades de tipo NR2A con rutas de supervivencia y plasticidad y a los receptores de tipo NR2B con rutas que conducen a la muerte neuronal. ¿De qué dependería esta localización preferencial? La respuesta a esta pregunta parece radicar en las interacciones de

los receptores por su dominio citoplasmático con diferentes complejos proteicos que permiten el tráfico, el anclaje y la señalización intracelular del receptor NMDA. Como hemos dejado entrever previamente, en este proceso van a jugar un papel fundamental las proteínas MAGUKs y las interacciones preferenciales de éstas con las subunidades NR2A y NR2B, confiriendo al receptor distintas propiedades como su grado de movilidad a lo largo de la membrana (Allison et al., 1998; Sans et al., 2000; 2005; ver revisión de Petralia, 2012).

C. Regulación del tráfico, inserción, localización y señalización del receptor NMDA mediada por las proteínas MAGUKs

Tras su síntesis, los receptores NMDA se encuentran ensamblados en el retículo endoplásmico, desde donde, a través de vesículas intracelulares, viajan a los diferentes compartimentos dendríticos, incorporándose en la membrana plasmática de las neuronas postsinápticas. En este proceso de tráfico e inserción así como de estabilización de los mismos en la membrana plasmática, juegan un papel fundamental la familia de *proteínas MAGUKs*, pertenecientes al grupo de proteínas de anclaje-PDZ.

La familia de proteínas MAGUK se encuentra codificada por 4 genes distintos, que incluyen PSD95 (Densidad postsináptica 95)/SAP90 (Proteína asociada a la sinapsis 90), PSD93, SAP102 y SAP97, que comparten una estructura conservada común, consistente en 3 dominios en tándem de tipo PDZ (*Disc Large*, *Zona occludens 1*), un dominio SH3 (Dominio homólogo al Src 3) y un dominio inactivo GK (Dominio guanilato quinasa) (Kim y Sheng, 2004; Pawson y Scott, 1997; Songyang et al., 1997). La interacción de los receptores NMDA con las proteínas de la familia MAGUK se produce a través del extremo C-terminal de las subunidades de tipo NR2 y los dominios PDZ de las proteínas MAGUKs, mientras que los dominios SH3 y GK interaccionan con el citoesqueleto y con diferentes complejos intracelulares de señalización.

Como se esquematiza en la **Figura 1.15**, esta interacción posibilita el transporte del receptor a la membrana, es fundamental para el anclaje de los mismos en el compartimento postsináptico, para su estabilización, y también para la distribución en la sinapsis o en la periferia de la misma (Bard et al., 2010; Bard y Groc, 2011).

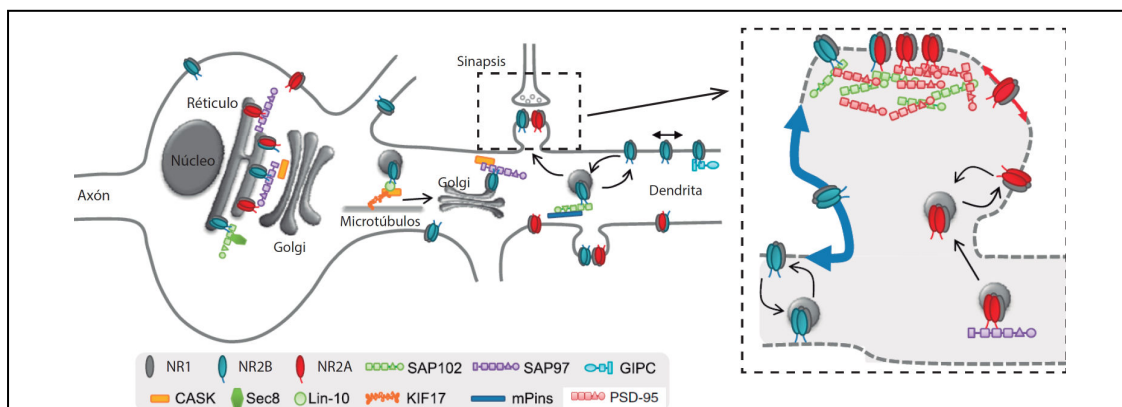


Figura 1.15. Papel de las proteínas de la familia MAGUK en el tráfico intracelular y la localización en la sinapsis de los receptores NMDA. Las subunidades de los receptores se encuentran ancladas al retículo endoplásmico. La NR2B se ancla a la proteína SAP102, lo que posibilita la interacción con sec8 (Subunidad 8 del complejo de exocitosis). Los receptores NMDA se transportan a través del complejo de Golgi y los microtúbulos gracias a la interacción con el complejo KIF17 (Proteína de tipo quinesina 17)/CASK (Serina quinasa de calcio)/m-lin10. En el retículo, la subunidad NR2B puede también interaccionar con SAP97 y CASK, dando lugar a otro tipo de transporte. La asociación del complejo NR2B/SAP102 con mPins (Homólogo en mamíferos del “compañero” de *inscutable* en *Drosophila melanogaster*) promueve la inserción de los receptores en la membrana. Como se muestra en la ampliación de la derecha, gracias a las proteínas PSD95 y SAP102, los receptores son capaces de desplazarse desde los sitios sinápticos a los extrasinápticos y viceversa (Adaptado de Bard y Groc, 2011).

De hecho, en la membrana postsináptica, las proteínas MAGUKs presentan una localización diferencial. Mientras que la proteína PSD95 se localiza mayoritariamente en la sinapsis (El-Husseini et al., 2000; Kim y Sheng, 2004), Sap102 se encuentra distribuida entre los sitios sinápticos y extrasinápticos (Al-Hallaq et al., 2007; Prybylowski et al., 2005; Sans et al., 2000). Si además tenemos en cuenta que la subunidad NR2A interacciona de manera preferente con PSD95 y la subunidad NR2B con SAP102, nos encontramos con un modelo en donde la interacción diferencial de las subunidades NR2 con las distintas

proteínas MAGUKs determina la localización sináptica o extrasináptica del receptor NMDA (Prybylowski et al., 2005).

Aunque las MAGUKs presentan una estructura conservada, difieren a nivel de su extremo N-terminal. PSD95 se encuentra palmitoilada en diversos residuos de cisteína presentes en su extremo N-terminal (Schlüter et al., 2006), lo que hace que esta proteína sea estable en la sinapsis. Por el contrario, el extremo N-terminal de SAP102 carece de palmitoilación, lo que la convierte en una proteína con una alta movilidad a diferencia del resto de MAGUKs. Dada su mayor afinidad por la subunidad NR2B, la interacción SAP102/NR2B dota a esta subunidad de una mayor movilidad en comparación con la que presenta la interacción PSD95/NR2A, permitiendo el desplazamiento desde los sitios sinápticos hasta los extrasinápticos. Sin embargo, ya que el dominio PDZ de la subunidad NR2A y NR2B es similar, la unión preferencial de SAP102 con NR2B ha de ser independiente del dominio PDZ. De hecho, varios estudios recientes realizados por el grupo de Roche y colaboradores (Chen et al., 2011; 2012a) describen una nueva interacción entre SAP102 y NR2B independiente del dominio PDZ de la subunidad, la cual resulta fundamental para la difusión lateral de los receptores en la membrana y, por tanto, para su localización en la misma.

El número de receptores NMDA, su composición, así como su interacción con las proteínas MAGUKs en la sinapsis está regulado no solo por la síntesis proteica y regulación génica de manera estímulo-dependiente, sino también por un proceso de degradación a través del proteasoma que depende de la actividad sináptica (**Figura 1.16**)

Por último, las proteínas MAGUKs también van a jugar un papel fundamental en el control de las señales intracelulares resultantes de la activación de los

receptores NMDA, al interaccionar con cascadas de señalización intracelulares (ver revisiones de Elias y Nicoll, 2007; Lau y Zukin, 2007).

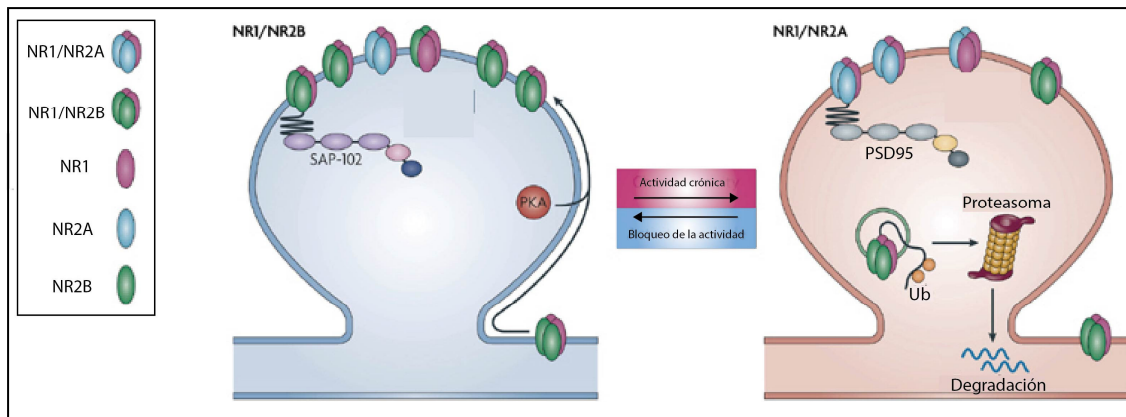


Figura 1.16. La actividad sináptica regula la composición de la sinapsis. La actividad neuronal remodela la composición de la PSD. Mientras que el bloqueo de la actividad promueve el incremento de los receptores de tipo NR2B y de Sap102 gracias a la fosforilación por PKC (proteína-quinasa C), la actividad crónica incrementa los niveles de la subunidad NR2A y de la proteína MAGUK PSD95 en la PSD. Además este proceso se realiza en paralelo a una robusta degradación por parte del proteasoma de NR1, NR2B y Sap102 (ver revisión de Lau y Zukin, 2007).

D. Regulación mediante modificaciones post-traduccionales

Finalmente, las diferentes subunidades están sujetas a una serie de modificaciones post-traduccionales entre las que se incluyen la palmitoilación y la nitrosilación pero, sin duda, el ejemplo mejor caracterizado de este tipo de modificaciones es la modulación de la señal del receptor mediante fosforilación (revisado en Chen y Roche, 2007). Como se observa en la **Figura 1.17**, las fosforilaciones detectadas para cada una de las subunidades son múltiples, y gran cantidad de quinasas participan en este proceso de regulación.

Alguno de los ejemplos más destacados es el llevado a cabo por CAMKII en el residuo S1303 de la subunidad NR2B. Esta fosforilación del receptor situado en los sitios sinápticos es indispensable para el mantenimiento de la LTP (Potenciación a largo plazo) (Bayer et al., 2001; Raveendran et al., 2009; Sanhueza et al., 2011).

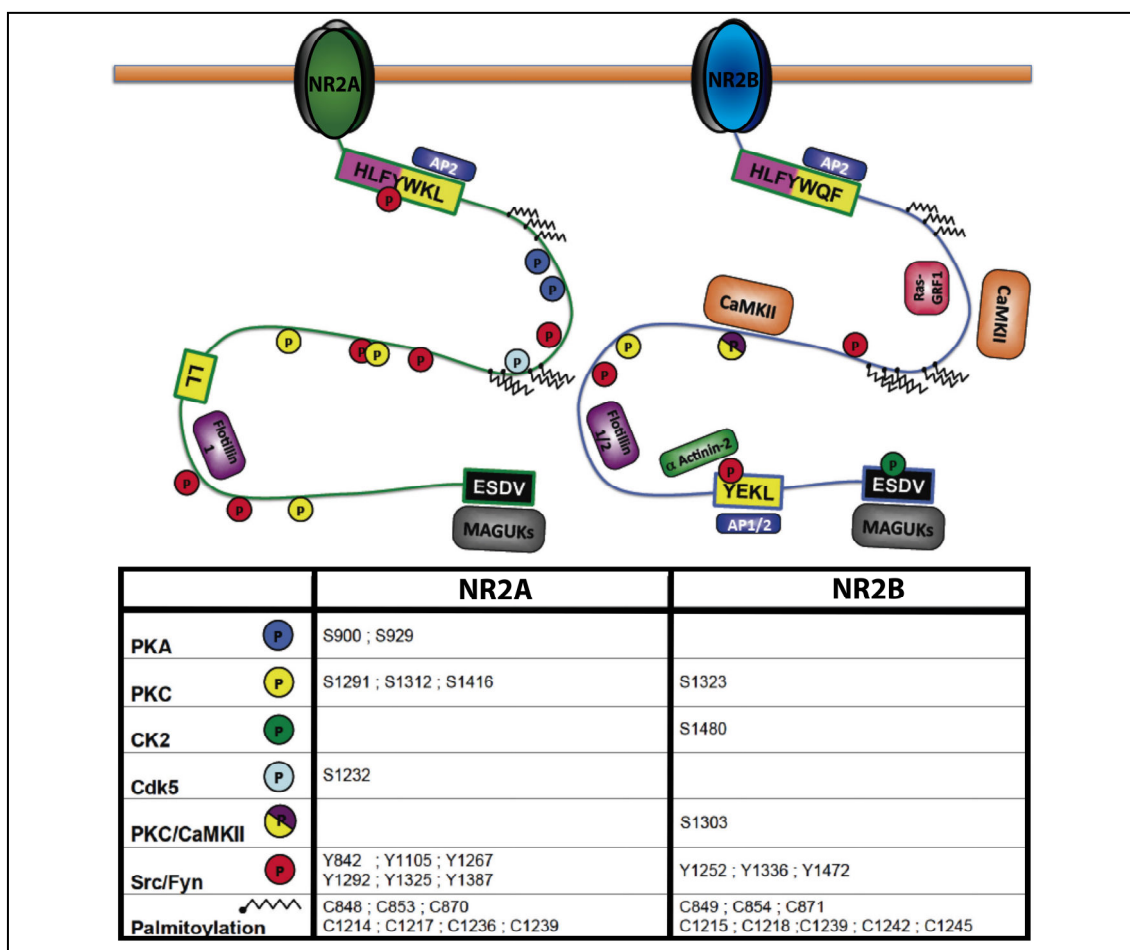


Figura 1.17. Modificaciones post-traduccionales asociadas a las subunidades NR2A y NR2B. En la imagen y en la tabla inferior aparecen marcados los principales residuos sujetos a fosforilación de las diferentes subunidades, así como las quinasas responsables de las mismas. De igual forma, se muestran las secuencias de aminoácidos responsables de la interacción de las subunidades con diversos complejos proteicos como es la secuencia de interacción con las MAGUKs (marcada en negro), la secuencia que permite el reciclaje de los receptores (marcada en amarillo) y la que permite el transporte de los receptores a la membrana desde el retículo (marcada en rosa). Como se observa, estas secuencias son objeto de fosforilación y actuarán modulando el funcionamiento del receptor a distintos niveles. Además también se muestran las regiones sometidas a palmitoilación (Esquema adaptado de la revisión de Chen y Roche, 2007; Sanz-Clemente et al., 2013).

Otras quinasas como PKA (proteína-quinasa A), PKC (proteína-quinasa C) y las proteínas quinasas de tirosinas Src y Fyn median la fosforilación de las subunidades en residuos específicos de serina, treonina y tirosina, donde las consecuencias de la fosforilación son contexto-específicas y dependerán del residuo fosforilado así como de la subunidad afectada por esta modificación post-traducciona (Lau et al., 2004; Leonard y Hell, 1997; Sala y Sheng, 1999).

1.5.3.4 Regulación del receptor NMDA tras la isquemia cerebral

A lo largo de estos apartados ha quedado establecido como la regulación de los receptores NMDA es un proceso multifactorial, que en su conjunto media el correcto funcionamiento del receptor. Si regresásemos a la **Figura 1.10**, ya no podríamos considerar a los distintos procesos que actúan en la modulación del receptor como procesos individuales, sino como una intrincada red en donde todos estos mecanismos interaccionan entre sí, convergiendo finalmente sobre el receptor.

Como se observa en la **Tabla 1.4**, tras el proceso isquémico, en mayor o menor medida, todos los mecanismos encargados del mantenimiento funcional del receptor se alteran, exacerbando el daño producido a consecuencia de la isquemia.

El conocimiento en profundidad de estos mecanismos reguladores, así como su contribución al daño isquémico dependiente de los receptores NMDA, abre nuevas posibilidades para las terapias neuroprotectoras basadas en bloquear la acción dañina del receptor a través de la modulación de los factores que regulan el mismo, sin la necesidad del antagonismo total del receptor NMDA, evitando así los efectos adversos que esta inhibición conlleva como consecuencia del crucial papel del receptor NMDA a nivel fisiológico.

	Cambios observados tras el ictus isquémico	Referencias
Receptores NMDA Sinápticos vs. Extrasinápticos	<p>-Los autores observan cómo, ante ciertas condiciones, los receptores sinápticos de las neuronas hipocampales contribuyen al daño tras la isquemia cerebral.</p> <p>- En este estudio muestran cómo, tras la isquemia, la sobreactivación de los receptores extrasinápticos a través de la interacción con la DAPK1 contribuye al daño isquémico.</p> <p>-Los autores demuestran cómo, la activación de los receptores extrasinápticos promueve la degradación de STEP por la calpaína, y cómo la activación de esta ruta participa en el daño tras la isquemia cerebral.</p>	<p>Wroge et al., 2012</p> <p>Tu et al., 2010</p> <p>Xu et al., 2009</p>
Subunidad NR2A vs. NR2B	<p>-Todos estos estudios ponen de manifiesto la diferente contribución de las subunidades NR2A y NR2B tras la isquemia cerebral. La activación de los receptores de tipo NR2B estaría implicada en el daño isquémico, mientras que la NR2A antagonizaría las acciones del NR2B y promovería procesos de plasticidad y supervivencia.</p> <p>-Los diferentes estudios describen el proceso de fragmentación proteolítica que sufren los receptores tras la isquemia cerebral, y cómo esta fragmentación, dependiendo de la subunidad, interfiere en su función.</p>	<p>Chen et al., 2008; Liu et al., 2007; Terasaki et al., 2010</p> <p>Gascón et al., 2008; Guttman et al., 2001; Guttman et al., 2002; Yuen et al., 2008</p>
Proteínas de anclaje MAGUKs	<p>- En estos estudios se muestra cómo tras el ictus, la interacción de la proteína PSD95 con la enzima nNOS, incrementa la producción de NO mediando el daño neuronal.</p> <p>-Los autores demuestran cómo bloqueando la interacción entre PSD95 y los receptores NMDA se promueve el reclutamiento de CAMKII y la activación de CREB mediando neuroprotección.</p>	<p>Aarts et al., 2002; Christopherson et al., 1999; Cook et al., 2012; Cui et al., 2007; Yuen et al., 2008; Zhou et al., 2010</p> <p>Bell et al., 2013</p>
Modificaciones post-traduccionales	<p>-En esta revisión se describen de manera pormenorizada las diferentes fosforilaciones a las que se encuentran sometidas las subunidades NR2A y NR2B tras un ictus isquémico.</p> <p>-Este reciente estudio muestra los múltiples sitios de fosforilación que presentan los receptores NMDA en modelos animales de isquemia/reperfusión.</p>	<p>Chen y Roche, 2007</p> <p>Zhang et al., 2013a</p>

Tabla 1.4. Cambios observados tras diferentes modelos de isquemia experimental que afectan al funcionamiento de los receptores NMDA.

1.6 EL RECEPTOR PARA HIDROCARBUROS DE ARILO (AHR)

1.6.1 Perspectiva histórica

Los xenobióticos, tales como pesticidas, disolventes y muchos otros productos químicos industriales de bajo peso molecular, son una de las mayores fuentes de contaminación ambiental. A lo largo de la historia, la exposición accidental a hidrocarburos aromáticos policíclicos o a hidrocarburos aromáticos halogenados (*PAHs* y *HAHs*, respectivamente) ha revelado los riesgos para la salud pública que suponen este tipo de compuestos (Vanden Heuvel y Lucier, 1993). Uno de los ejemplos más frecuentes es la exposición deliberada o accidental a dioxinas o TCDDs (2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo-p-dioxina), compuestos que pertenecen a la familia de los HAHs. Entre estas exposiciones destaca la que se produjo durante la guerra de Vietnam, a través del uso por parte de Estados Unidos del “Agente Naranja”, un herbicida y defoliante que fue esparcido sobre Vietnam, Laos y Camboya, en la operación “*Ranch Hand*”, que tenía como única finalidad la deforestación de bosques y pueblos de Vietnam. El agente naranja estaba compuesto por 2,4,5-triclorofenoxiacético y 2,4-diclorofenoxiacético, el primero de los cuales contenía trazas de TCDD. No fue hasta 1964 cuando una de las fábricas de herbicidas (Dow), encargadas de llevar a cabo la síntesis del agente naranja, informó de los posibles peligros que suponía la exposición al TCDD, después de que varios de sus empleados desarrollaran cloracné, una dolorosa y desfigurante enfermedad de la piel. Sin embargo, el agente naranja siguió esparciéndose en los campos vietnamitas causando terribles secuelas en la población vietnamita y en los soldados estadounidenses (Beischlag et al., 2008).

En la actualidad, según la Organización Mundial de la Salud, la detección de dioxinas y compuestos relacionados en productos alimentarios es bastante

frecuente, como la contaminación detectada en 2008 en Irlanda en productos porcinos o, en 2007, al detectarse la presencia de altas concentraciones de dioxina en un aditivo alimentario procedente de la India, la goma guar. Por este motivo, se llevan a cabo exhaustivos controles para la detección de la dioxina así como de otros tipos de PAHS y HAHs.

El campo de investigación del receptor para hidrocarburos de arilo (AhR) tiene sus orígenes en la toxicología de este tipo de compuestos en vertebrados. En la década de los 60 y de los 70, los estudios centrados en el metabolismo y detoxificación de xenobióticos demostró que la exposición a estas sustancias inducía una batería de enzimas que, de manera dual, actuaban mediando su toxicidad al mismo tiempo que, en algunos casos, protegían al organismo frente a la misma (Conney, 1982; Schrenk, 1998; Shimada, 2006). Como resultado de la caracterización de este metabolismo adaptativo se observó que diferentes cepas de ratón diferían en su respuesta a los xenobióticos (Niwa et al., 1975; Poland et al., 1974). El análisis de cruces entre cepas de ratón que respondían a los xenobióticos y otras que no tenían esa capacidad demostró que el responsable era un único locus autosómico dominante. A este locus se le denominó Ah (*aryl hydrocarbon responsiveness*) (Poland et al., 1987), que fue caracterizado como un receptor *bona fide* de este tipo de compuestos químicos y que es el responsable directo de los efectos tóxicos de los xenobióticos. Actualmente, a este receptor se le conoce como *el receptor para hidrocarburos de arilo* (AhR, de su nombre en inglés, *Aryl Hydrocarbon Receptor*) y, puesto que la dioxina es uno de sus ligandos xenobióticos mejor caracterizados, también es denominado “*receptor de dioxina*” (Fernández-Salguero et al., 1996).

Aunque AhR es principalmente conocido por su importante papel en el *metabolismo de xenobióticos* (Wilson y Safe, 1998), en la actualidad se sabe que desempeña importantes *funciones a nivel fisiológico*, participando de manera activa en el mantenimiento de la homeostasis celular (ver revisiones de Barouki

et al., 2007; Beischlag et al., 2008; Bock y Köhle, 2006; Esser et al., 2009; Furness y Whelan, 2009; Guyot et al., 2012).

1.6.2 AhR: un miembro de la familia de proteínas *bHLH/PAS*

AhR es un factor de transcripción activado por ligando que pertenece a la familia de *proteínas bHLH* (dominio básico hélice bucle hélice)/ *PAS* (Per-ARNT-Sim). En esta familia se encuentran incluidos factores de transcripción que juegan un papel fundamental en la regulación de xenobióticos, regulación por hipoxia, ritmos circadianos y desarrollo del sistema nervioso (revisado en Kewley et al., 2004a).

Estas proteínas se caracterizan porque, para formar un complejo transcripcional activo, necesitan dimerizar con otros miembros de la familia PAS (Taylor y Zhulin, 1999). Por ejemplo, AhR dimeriza con ARNT (Traslocador del receptor para hidrocarburos de arilo). Este proceso de dimerización se posibilita por la presencia de los dominios altamente conservados de tipo PAS.

El dominio PAS consiste en una región situada en el extremo N-terminal, de aproximadamente 230 a 300 aminoácidos, constituida por dos repeticiones adyacentes altamente degeneradas, denominas PAS A y PAS B. Además, también situado en el extremo N-terminal, se halla otra de las características estructurales principales de los miembros de esta familia, el dominio bHLH (de tipo hélice-bucle-hélice), un motivo necesario para la unión al ADN en las regiones E-Box, que se localizan en los promotores de los genes diana. En el extremo C-terminal, estas proteínas se caracterizan por presentar dominios de transactivación o represión (**Figura 1.18**).

Dependiendo de la capacidad de las proteínas de la familia PAS de formar homo- y/o heterodímeros, pueden ser subdivididas en dos grupos: Las *proteínas bHLH/PAS de tipo I*, como AhR, Hif-1 α (Factor inducible por

hipoxia-1 α) y Sim (*Single-minded*), que no presentan la capacidad de formar dímeros con proteínas de su clase, formando únicamente heterodímeros con las **proteínas bHLH/PAS de tipo II**, entre las que se incluyen ARNT, Per (Periodo) y BMAL (Proteína similar a ARNT de cerebro y músculo) y que presentan la capacidad de formar tanto heterodímeros como homodímeros (ver **Figura 1.18**) (Crews y Fan, 1999; Kewley et al., 2004a).

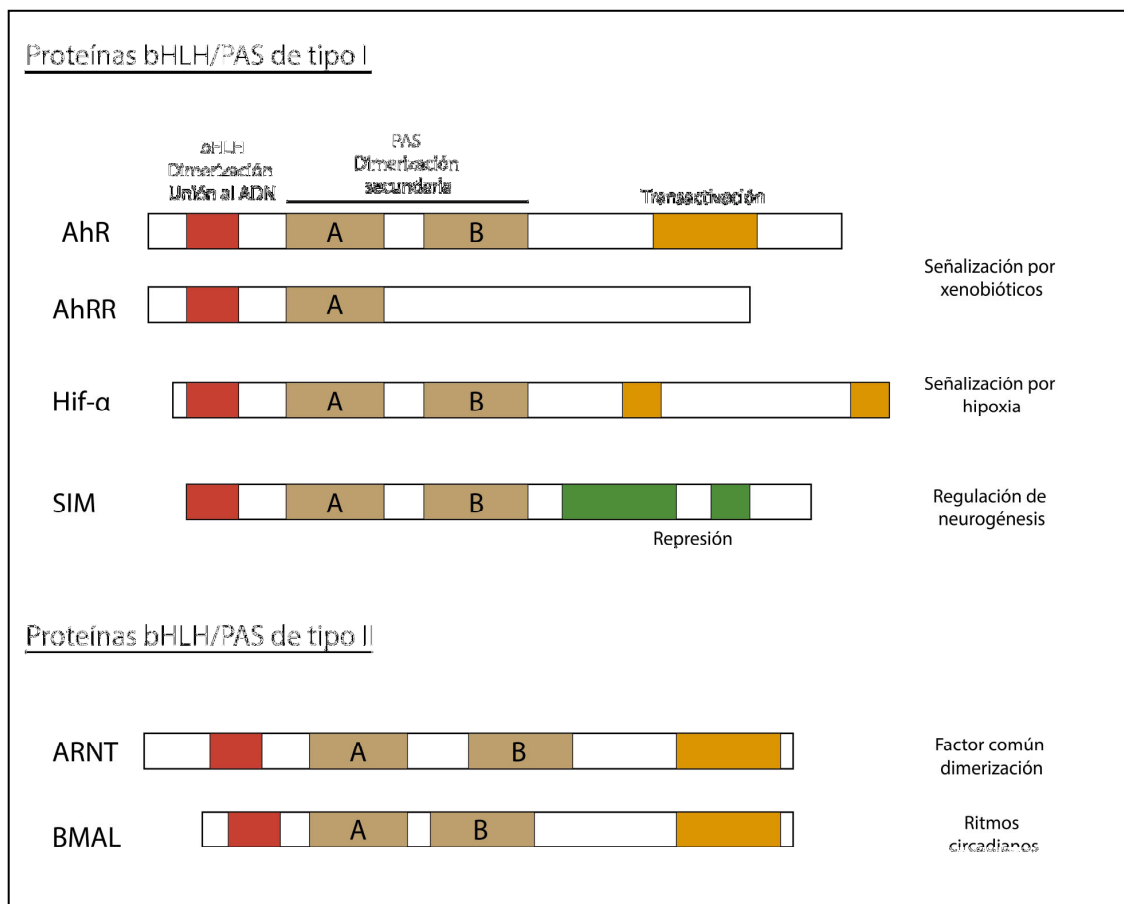


Figura 1.18. Miembros de la familia de proteínas bHLH/PAS. El dominio estructural hélice-bucle-hélice se representa en naranja. El dominio PAS, con sus dos repeticiones, PAS A y PAS B, se representa en marrón. Los dominios TAD (en amarillo) y represión (en verde) se sitúan en el extremo C-terminal (Esquema adaptado de Kewley et al., 2004a).

Como comentamos previamente, los estudios toxicológicos del metabolismo de xenobióticos llevados a cabo en diferentes cepas de ratón, determinó la existencia de diferentes variantes alélicas de AhR caracterizadas por responder o no a xenobióticos. En la actualidad, se han descrito 4 alelos polimórficos para

AhR que presentan diferencias en el extremo C-terminal. En ratón, estos alelos, nombrados de > a < capacidad de respuesta a xenobióticos, son AhR^{b-1}, AhR^{b-2}, AhR^{b-3} y la variante AhR^d incapaz de responder a xenobióticos. La presencia de variantes alélicas para AhR también se ha observado en rata así como en humanos, con 6 variantes alélicas descritas (I227V, P517S, R554K, V570I, Q666K, y R554K/V570I) (Harper et al., 2002). En todos los casos, las diferencias se producen en el dominio de transactivación presente en la región C-terminal.

1.6.3 Señalización clásica de AhR dependiente de ligando

Como se mencionó previamente, AhR se caracteriza por ser un factor de transcripción activado por ligando, en donde la unión a un agonista producirá una cascada de señalización intracelular que finalizará con la transcripción de la batería de sus genes diana. Aunque, ante determinados contextos, la activación del receptor AhR se ha descrito en ausencia de ligando, en general, su *vía canónica de activación* requiere la presencia de un agonista del receptor. Dentro de los ligandos que activan a AhR podemos distinguir dos tipos de agonistas principales, *los xenobióticos* y *los ligandos endógenos o naturales* (Ver revisiones de Beischlag et al., 2008; Nguyen y Bradfield, 2008).

1.6.3.1 Ligandos que activan al receptor AhR: Xenobióticos versus ligandos endógenos o naturales

A. Ligandos xenobióticos

La mayor parte de los xenobióticos conocidos que se unen y activan AhR son moléculas de tipo hidrofóbico que generalmente se incluyen dentro de 3 clases estructurales, los *HAHs*, los *PAHs* y los *PCBs* (bifeniles policlorados) (McKinney y Singh, 1981; Poland y Glover, 1977), los cuales presentan potentes efectos tóxicos y cancerígenos (**Tabla 1.5**).


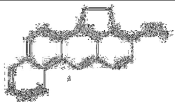

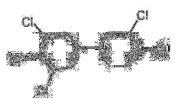
Familia	Compuesto	Estructura	Fuente	Referencias
HAHs	TCDD o Dioxina		La introducción de estos compuestos en el ambiente se produce a través de productos comerciales, como resultado de accidentes industriales o por residuos de incineración.	Ver referencias 1-6 en el pie de página
PAHs	3-metilcolantreno benzo-[a]-pireno	 	Resultado de procesos de combustión, encontrándose en hollín, altramuces a la parrilla y humo procedente del tubo de escape de los coches.	Ver referencias 7-11 en el pie de página
PBCs	3,3',4,4',5'-penta-clorobifenil		Se encuentran en productos comerciales como pigmentos, producen residuos al quemar y materiales aislantes.	Ver referencias 12-14 en el pie de página

Tabla 1.5. Principales ligandos xenobióticos que activan a AhR. (1-6) (Higginbotham et al., 1968; Kerkvliet et al., 1990; Nguyen y Bradfield, 2008; Niwa et al., 1975; Poland y Knutson, 1982; Schwetz et al., 1973); **(7-11)** (Barron et al., 2004; Conney, 1982; Poland y Glover, 1974); **(12-14)** (Bandiera et al., 1982; Safe, 1993; 1985).

B. Ligandos endógenos o naturales

Tal y como hemos visto en el apartado anterior, AhR se activa por compuestos que provienen principalmente de fuentes antropogénicas, y que no son sintetizados por los organismos vivos. Por tanto, la activación de AhR por este tipo de compuestos es probablemente un evento relativamente nuevo en la señalización de AhR en vertebrados a consecuencia de la presión evolutiva ya que, como se describirá en detalle en apartados posteriores, el ortólogo de AhR en invertebrados es incapaz de responder a xenobióticos (Emmons et al., 1999; Powell-Coffman et al., 1998). Como consecuencia, deben existir agonistas endógenos o naturales para este receptor. En la actualidad se conocen varios potentes agonistas endógenos capaces de activar a AhR (ver revisiones de Beischlag et al., 2008; Nguyen y Bradfield, 2008). Aunque su principal limitación es la baja concentración de los mismos en vertebrados, su concentración de manera local en determinados tejidos, como consecuencia de procesos fisiológicos concretos o situaciones patológicas, los sitúa como principales candidatos de la activación endógena de AhR de manera contexto-

dependiente. Estos compuestos pueden ser adquiridos *a través de la dieta*, pero también sintetizados de manera endógena por el organismo, como es el caso de *los derivados de ácido araquidónico, los metabolitos del grupo hemo, fotoproductos del triptófano y derivados del metabolismo del triptófano* (ver Tabla 1.6).

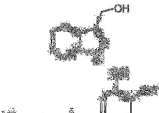



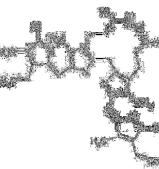



Clase	Compuesto	Estructura	Características	Referencias
Compuestos de la dieta	Indol-3-carbinol		Presente en vegetales como el brócoli y las coles de bruselas	Ver referencias 1-4 en el pie de Página
	Quercetina		Flavonoide de tipo natural	
Derivados del ácido araquidónico	Prostaglandinas		El metabolismo del AA se lleva a cabo de manera principal por las enzimas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), a través de las cuales se generan prostaglandinas, y por las lipoxigenasas (5-, 12- y 15-LOX), cuya producción principal incluye leucotrienos y lipoxinas. 6 prostaglandinas (E2, D2, F2a, G2, I1 y I2), así como la TXA2 (lipoxina A2), son activadores de AhR.	Ver referencias 5-10 en el pie de Página
	LipoxinaA4			
Metabolitos del grupo hemo	Bilirrubina		La bilirrubina se encuentra conjugada a la albúmina del suero, por lo que sus niveles libres son tan bajos que impiden su activación como ligando de AhR. Sin embargo, el síndrome de Crigler-Najjar o la ictericia cursan con un incremento de los niveles plasmáticos de la bilirrubina libre. En este contexto patológico se ha observado cómo la bilirrubina activa a AhR.	Ver referencias 11-14 en el pie de Página
Fotoderivados del triptófano	6-formilindolo-[3,2-b]carbazol		La irradiación UV del triptófano genera FICZ (6-formilindolo-[3,2-b]carbazol) y el 6FICZ (6,12-diformilindolo-[3,2-b]carbazol) que presentan una alta afinidad por AhR. Estos dos potentes agonistas se han implicado en el control de los ritmos circadianos, la modulación de la respuesta inflamatoria en enfermedades de tipo autoinmune así como en medir las respuestas al estrés oxidativo como consecuencia de la exposición a UV.	Ver referencias 15-17 en el pie de Página
Ruta de los indoles	Ácido-indol-acético		La ruta de los indoles tiene lugar de manera principal en el tracto gastrointestinal. Allí, el metabolismo del triptófano produce una compuesta principal, triptamina, ácido indol-acético (IAA) e indol. Estos tres metabolitos son potentes agonistas de AhR.	Ver referencias 18-21 en el pie de Página
Ruta de las kinureninas	L-kinurenina		La ruta de las kinureninas consiste en la degradación del L-triptófano en diferentes metabolitos para la producción del cofactor NAD. Varios metabolitos de esta ruta como L-kinurenina y el ácido kinurénico son agonistas de AhR.	Ver referencias 22-26 en el pie de Página

Tabla 1.6. Ligandos endógenos y/o naturales que activan a AhR. (1-4) (Ciolino et al., 1999; Zhang et al., 2003); **(5-10)** (Machado et al., 2006; Sanchez et al., 2010; Schaldach et al., 1999; Seidel et al., 2001); **(11-14)** (Phelan et al., 1998; Sinal y Bend, 1997); **(15-17)** (Helferich y Denison, 1991; Rannug et al., 1995); **(18-21)** (Nguyen y Bradfield, 2008; Vikström Bergander et al., 2012); **(22-26)** (Adams et al., 2012; DiNatale et al., 2010; Hao et al., 2013; McBerry et al., 2012; Opitz et al., 2011).

Un ligando endógeno de AhR descrito recientemente es la *L-kinurenina* (Adams et al., 2012; DiNatale et al., 2010; Hao et al., 2013; McBerry et al., 2012; Opitz et al., 2011). Este agonista de AhR se genera a partir de *la ruta de las kinureninas* (Figura 1.19), la cual consiste en la degradación del triptófano para la producción del cofactor enzimático NAD (adenina dinucleótido nicotinamida).

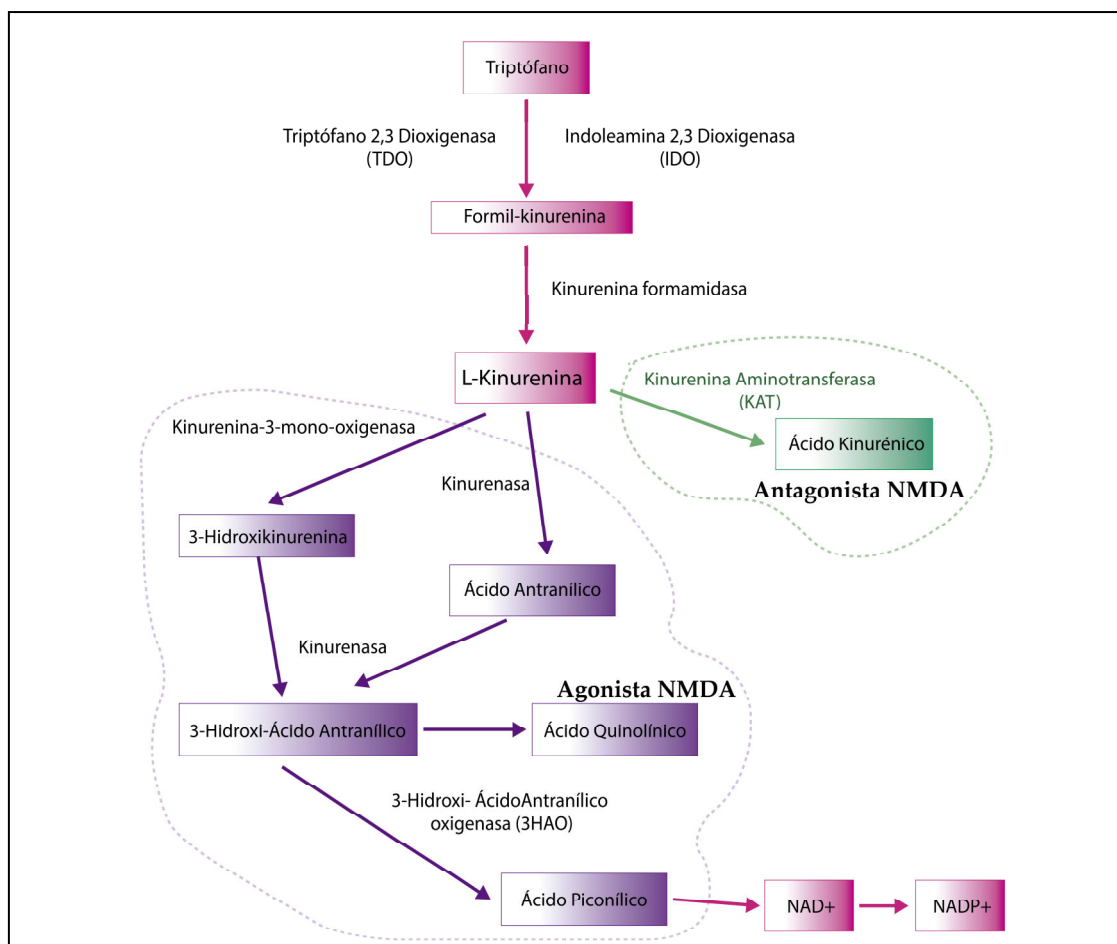


Figura 1.19. Representación esquemática de la ruta de oxidación del triptófano por la vía de las kinureninas. La secuencia de pasos de la degradación del triptófano hasta la producción del cofactor enzimático NAD incluye la producción de L-kinurenina, un posible candidato para la activación de AhR en el sistema nervioso central. Esta ruta también lleva asociada la producción de un potente agonista de los receptores NMDA como es el ácido quinolínico así como un antagonista de los receptores NMDA, el ácido kinurénico o KYNA (Esquema adaptado a partir de la revisión de Stone et al., 2012b).

La ruta de las kinureninas, en condiciones basales, tiene lugar de manera principal en el hígado ya que, una vez ingerido, la mayor parte del triptófano se

transporta a este órgano. Allí, a través de la *enzima TDO* (triptófano-2,3-dioxigenasa), el triptófano es degradado a formil-kinurenina, un producto altamente inestable que es transformado rápidamente en L-kinurenina, el metabolito limitante de esta vía, ya que a través de su producción se generan el resto de derivados del triptófano (Bertazzo et al., 2001; Rose, 1972). Aunque la TDO fue inicialmente identificada como una enzima hepática, su expresión y función es también neuronal (Thackray et al., 2008). Además de la TDO, la producción de L-kinurenina se lleva a cabo por una segunda enzima, la *IDO* (indoleamina-2,3-dioxigenasa), que se expresa de manera ubicua, y cuya actividad es inducida por la exposición a interferón γ (IFN- γ) e interleuquina 2 (IL-2) como consecuencia de procesos inflamatorios (Carlin et al., 1989; Takikawa et al., 1990).

De manera reciente, gran cantidad de estudios han focalizado su atención en la ruta de las kinureninas, cuya implicación se ha propuesto en diferentes patologías del sistema nervioso central, como esclerosis múltiple, enfermedades neurodegenerativas tipo Alzheimer, Parkinson y Huntington, así como en depresión y en el ictus isquémico. En estas patologías, diversos derivados de la ruta se presentan como mediadores del daño neuronal y, por tanto, son posibles dianas para futuras intervenciones terapéuticas (Darlington et al., 2007; Guillemín et al., 2003b; Lim et al., 2010; Schwarz et al., 2012; Zinger et al., 2011; revisado en Stone et al., 2012a; 2012b).

Como comentábamos previamente, en condiciones fisiológicas, la oxidación del triptófano tiene lugar principalmente en el hígado; sin embargo, ante situaciones inflamatorias, estrés o condiciones relacionadas, infecciones y estrés oxidativo, el metabolismo del triptófano pasa a ser extrahepático, teniendo lugar de manera principal en la sangre y en el tejido linfoide. Ante estas circunstancias, los niveles de L-kinurenina son mucho más elevados que los observados en condiciones fisiológicas y, como consecuencia, esta molécula es

capaz de atravesar la BHE y ser metabolizada a diferentes compuestos que tienen la capacidad de ser potentes antagonistas o agonistas de los receptores NMDA (ácido kinurénico y ácido quinolínico, respectivamente) (Perkins et al., 1982; Stone y Darlington, 2002; Stone y Perkins, 1981). Aunque, de manera mayoritaria, la L-kinurenina encontrada en el cerebro proviene de la periferia, este metabolito del triptófano puede ser también generado de manera local en el cerebro (Gál y Sherman, 1980). En este contexto, los astrocitos y la microglía parecen jugar un papel fundamental en la producción de L-kinurenina y compuestos derivados (Guillemin et al., 2003a; Guillemin et al., 2005). Sin embargo, determinados tipos neuronales también expresan las enzimas TDO e IDO lo que las capacita para la producción de la L-kinurenina (Guillemin et al., 2007; Miller et al., 2004).

En el contexto del ictus isquémico, el grupo de Heyes y colaboradores fue el primero en demostrar cómo la ruta de las kinureninas estaba asociada al daño cerebral tras isquemia (Heyes et al., 1993; Saito et al., 1993), confirmándose estos resultados posteriormente con la demostración de que la inhibición de determinadas enzimas de la ruta disminuían el daño cerebral y la excitotoxicidad en modelos experimentales de isquemia cerebral (Behan y Stone, 2000; Harris et al., 1998). Recientemente, existen varios estudios clínicos que muestran un incremento a nivel plasmático en el metabolismo del triptófano a través de la ruta de las kinureninas, representado por un incremento en los niveles de L-kinurenina. Estos niveles se correlacionan con un peor pronóstico de la enfermedad, con un deterioro cognitivo post-ictus, así como un incremento en el porcentaje de mortalidad (Darlington et al., 2007; Gold et al., 2011). Por tanto, pese a la capacidad de alguno de los metabolitos de la ruta de las kinureninas de antagonizar la acción de los receptores NMDA, en el contexto de la isquemia cerebral, el incremento en el metabolismo de la misma se correlaciona de manera directa con un mayor daño.

Ya que el factor limitante para la activación de AhR por ligandos endógenos es la baja concentración de los mismos en condiciones fisiológicas, el incremento en la producción de la L-kinurenina tras el ictus isquémico, sitúa a la L-kinurenina como un importante candidato capaz de mediar la activación de AhR a nivel periférico y también, a nivel del SNC, dada su síntesis local así como su capacidad para atravesar la BHE.

1.6.3.2 Ruta canónica del receptor AhR

La ruta clásica de activación del receptor AhR por un ligando se muestra en la **Figura 1.20**.

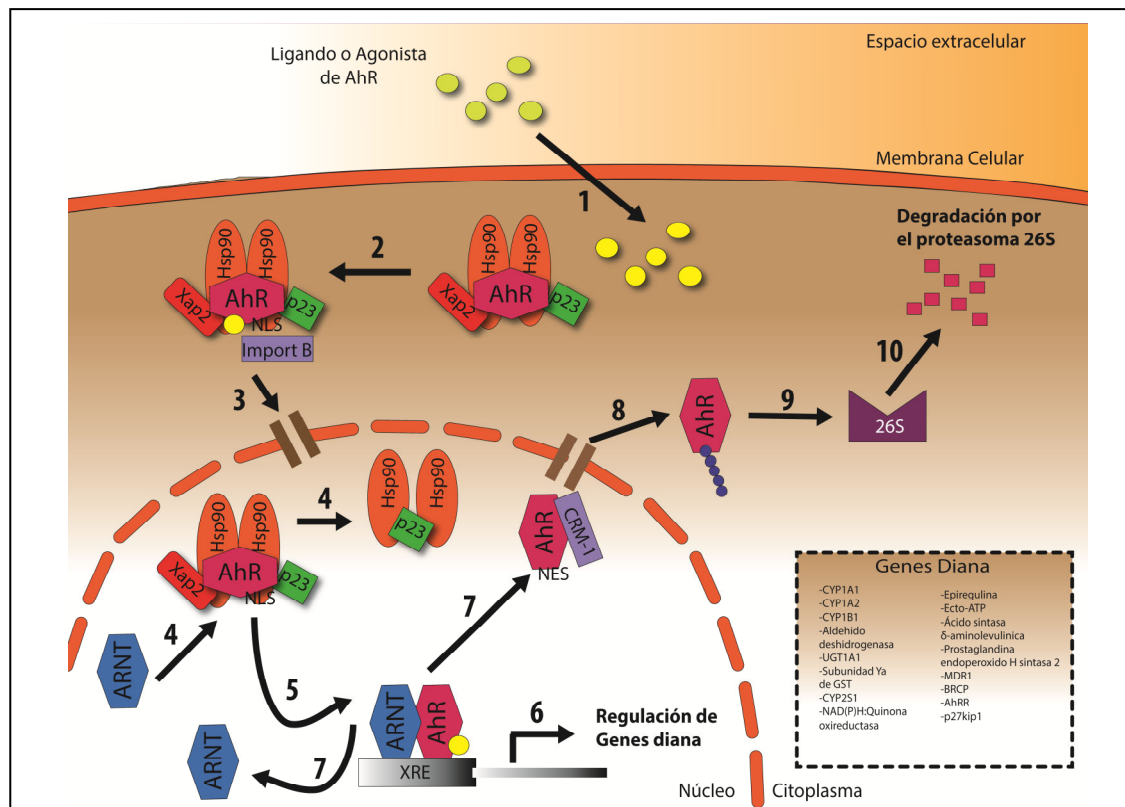


Figura 1.20. Ruta canónica de señalización del receptor AhR. En ausencia de ligando, AhR se encuentra chaperonado en el citoplasma (1). En presencia de una agonista, se produce un cambio conformacional en el receptor, permitiendo la exposición de una secuencia de importación nuclear (2), lo que permite al complejo AhR trasladarse al núcleo (3). Una vez en el núcleo, se produce el intercambio del complejo de chaperonas por el factor ARNT (4). El heterodímero AhR/ARNT interacciona con las secuencias consenso XRE en las regiones promotoras de los genes diana (5) promoviendo la transcripción de la batería de genes de AhR (6). Una vez finalizada la señal, AhR se transporta al citoplasma gracias a la exposición de una secuencia de exportación nuclear dependiente de CRM-I (7). Una vez en el citoplasma, AhR es ubiquitinado (8) y finalmente será degradado por el proteasoma 26S (9 y 10).

En ausencia de un ligando de AhR (bien sea un xenobiótico o un ligando endógeno), la gran mayoría del receptor se encuentra situado en el citoplasma, o, dependiendo del tipo celular, entre el citoplasma y el núcleo (Pollenz et al., 1994; Singh et al., 1996). En el citoplasma, AhR forma un complejo transcripcionalmente inactivo al interaccionar con un dímero de la chaperona HSP90 (Proteína de choque térmico 90) (Denis et al., 1988; Perdew, 1988), con la co-chaperona p23 (Kazlauskas et al., 1999) y una proteína de tipo inmunofilina denominada ARA9 (Proteína asociada al receptor AhR), XAP2 (Proteína asociada al virus de la hepatitis B) o AIP1 (Proteína de interacción con AhR) (Carver y Bradfield, 1997; Ma y Whitlock, 1997; Meyer et al., 1998). La inactividad transcripcional de este complejo viene determinada por la imposibilidad de AhR de dimerizar con ARNT cuando el receptor se encuentra unido a HSP90, ya que ambas interacciones se producen a través de los dominios HLH y PAS, y por tanto, son mutuamente excluyentes (Fukunaga et al., 1995; Perdew y Bradfield, 1996; Reisz-Porszasz et al., 1994).

En presencia de un ligando, AhR sufre un cambio conformacional que permite la exposición de una señal de localización nuclear (señal bipartita, localizada en los aminoácidos 13-17, 37-42) (Ikuta et al., 1998). Esta señal es reconocida por la importina- β (Petrulis et al., 2003), produciendo la traslocación de AhR al núcleo junto al complejo citosólico HSP90/p23/XAP2 (Heid et al., 2000; Lees y Whitelaw, 1999). Una vez en el núcleo, se produce el intercambio del complejo de chaperonas HSP90/p23 por la proteína ARNT (Reyes et al., 1992; Swanson et al., 1995), formándose un heterodímero funcional que se une a secuencias específicas en las regiones promotoras de los genes dianas, comúnmente denominadas *DRE* o *XRE* (Elementos de respuesta a dioxina o elementos de respuesta a xenobióticos, respectivamente), cuya secuencia consenso es 5'-TnGCGTG A/G G/C A -3 (Denison et al., 1988; Watson y Hankinson, 1992).

Esta asociación es esencial para la inducción de la batería de genes que codifican para varias de las *enzimas responsables del metabolismo de xenobióticos*, entre las que se incluyen Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp1b1, la subunidad Ya de GST (*glutathione S-transferase*), NADPH/Quinona oxidoreductasa y la aldehído deshidrogenasa (Beischlag et al., 2008; Furness y Whelan, 2009; Hankinson, 1995). Estos genes, especialmente Cyp1a1, son ampliamente utilizados para estudiar la señalización mediada por AhR-dioxina.

Además, AhR puede interaccionar con una diversidad de elementos respuesta cuya secuencia consenso difiere de la de los XRE vista previamente. En este caso, las acciones promovidas por la activación del receptor son capaces de modular, promover e incluso inhibir la transcripción de los genes diana a cuya región promotora se une. En este caso, el conjunto de genes regulados por la activación de AhR suele apartarse de la batería de genes xenobióticos anteriormente citados (Gouédard et al., 2004; Matikainen et al., 2001).

El complejo transcripcional, una vez unido a las secuencias consenso, puede modificar su acción gracias al reclutamiento de distintos co-activadores mediante la interacción con el dominio de transactivación (TAD) situado en el extremo C-terminal de AhR. Entre estos coactivadores se encuentran CBP/p300 (Proteína de unión a CREB) (Arany et al., 1996; Kallio et al., 1998; Kobayashi et al., 1997), p160/SRC-1 (Coactivador del receptor de estrógenos 1) (Beischlag et al., 2002; Kumar y Perdew, 1999), NCoA2 (Coactivador de receptores nucleares 2) y pCIP (Proteína de interacción con CBP) (Beischlag et al., 2002), RIP140 (Proteína de interacción con receptores nucleares 140) (Kumar et al., 1999) y P-TEFb (Factor de elongación II) (Kobayashi et al., 1997).

1.6.4 Señalización alternativa de AhR: Actividad E3 ubiquitina ligasa dependiente de ligando

Además de su función como factor de transcripción, AhR también actúa como una *ubiquitina E3 ligasa* formando parte del complejo *Cullin4B/E3 Ubiquitina ligasa*. En general, las E3 ligasas actúan como subunidades de reconocimiento, permitiendo a enzimas E2 conjugadoras de ubiquitina marcar al sustrato para su degradación por el proteasoma 26S (Schwartz y Ciechanover, 2009). El complejo CUL4B_{AhR} está constituido por la proteína de anclaje CUL4B, la proteína β -transducina TBL3, la proteína RBX1 (*Ring box protein 1*), la subunidad 19S del proteasoma, la proteína DDB (Proteína de unión al ADN dañado 1), ARNT y AhR (**Figura 1.21**).

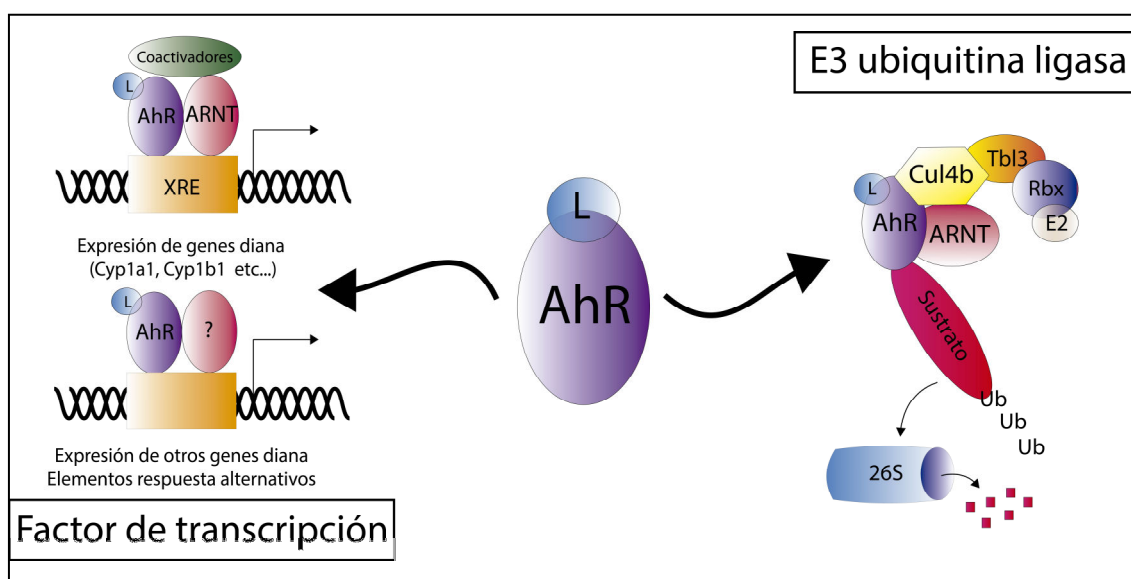


Figura 1.21. Papel dual del receptor AhR como factor de transcripción y como E3 ubiquitina ligasa. AhR es capaz de controlar la expresión proteica de sus genes diana a través de mecanismos que incluyen su actividad como factor de transcripción a través de la unión a los elementos respuesta clásicos (XRE) o a través de unión a secuencias consenso que difieren de los XRE; en este caso, AhR puede interaccionar con otros factores de transcripción diferentes a ARNT. Además, AhR también es capaz de modular los niveles proteicos al actuar como E3 ubiquitina ligasa en el complejo Cul4B, en donde AhR actúa como subunidad de reconocimiento del sustrato que va a ser degradado, permitiendo a la enzima E2 ubiquitinar a la proteína en cuestión (Barouki et al., 2007; Bock y Köhle, 2006; Harper et al., 2006; Oesch-Bartlomowicz et al., 2005; Ohtake et al., 2007).

Para que se produzca la formación del complejo, y posterior degradación del sustrato, es necesaria la activación de AhR dependiente de ligando. Hasta la fecha, las únicas proteínas identificadas que se degradan a través del complejo CUL4B^{AhR} son la proteína β -catenina, el receptor de estrógenos y el receptor de andrógenos (Kawajiri et al., 2009; Ohtake et al., 2007).

1.6.5 Regulación de la señal de AhR

Dado su papel esencial en la modulación de los niveles celulares proteicos mediante su acción dual como factor de transcripción y E3 ubiquitina ligasa, no es de extrañar, que la expresión de AhR se encuentre altamente regulada, de tal forma que diversos mecanismos converjan en la regulación de los niveles de este receptor así como en la señal promovida por él (**Figura 1.22**) (Revisado en Fujii-Kuriyama y Kawajiri, 2010; Harper et al., 2006).

1.6.6 Papel dual de AhR: Metabolismo de xenobióticos *versus* papel fisiológico

La toxicidad producida por la activación de AhR por xenobióticos ha sido ampliamente estudiada, en lo que respecta a las acciones producidas por el TCDD. Entre los efectos principales de este compuesto destacan su capacidad tumorigénica y la profunda supresión del sistema inmune (Higginbotham et al., 1968; Schwetz et al., 1973). Además, el análisis de la expresión génica dependiente de AhR tras ser activado por dioxina ha revelado cambios en genes implicados en respuesta a estrés, diferenciación y proliferación, apoptosis, adhesión celular, migración, así como en la modulación del metabolismo de esteroides, ácido retinoico y lípidos (Fletcher et al., 2005; Hayes et al., 2007). Todas estas respuestas parecen ser contexto-dependientes, y podrían resultar bien de una señalización directa a través de AhR, o de la disrupción de procesos

fisiológicos y/o interacción con otras rutas en las que el receptor participe de manera normal (Puga et al., 2000a; 2000b).

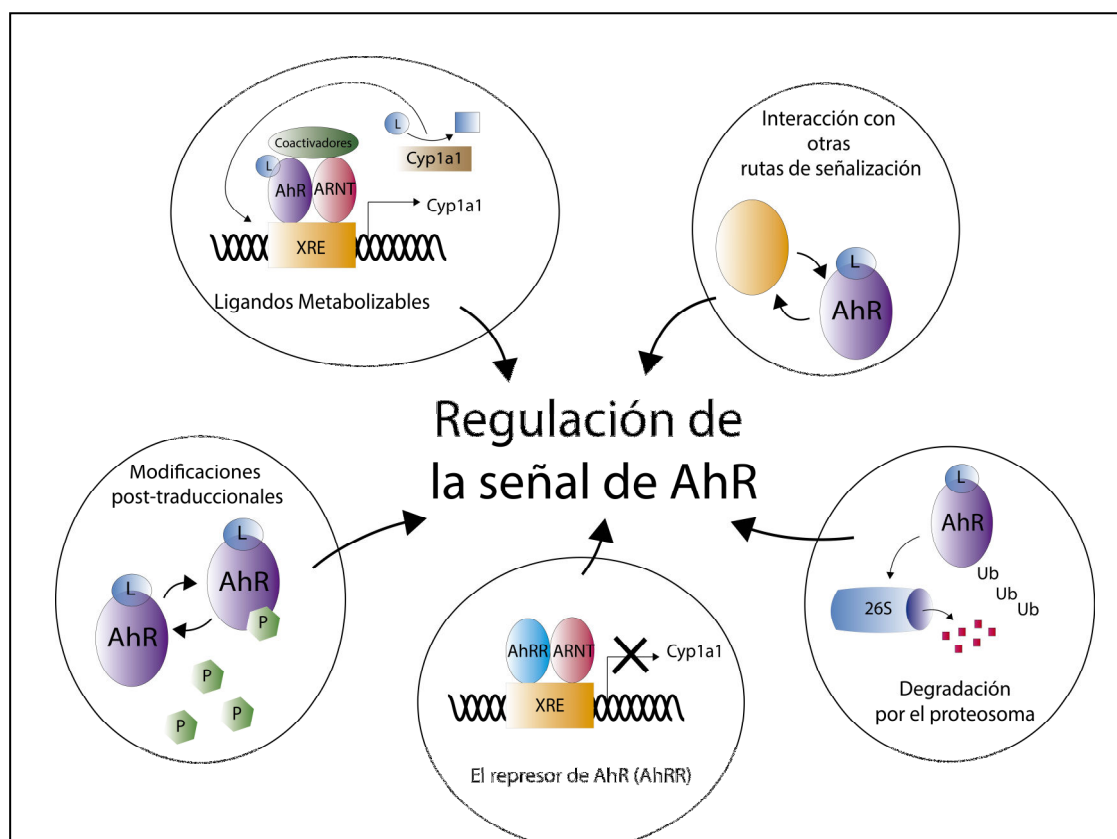


Figura 1.22. La vía de señalización del receptor AhR se encuentra modulada a múltiples niveles. (A) **Ligandos metabolizables:** Las enzimas del citocromo p450, como Cyp1a1, participan en la degradación de gran parte de los ligandos xenobióticos y ligandos naturales de AhR. De esta forma, la inducción de las enzimas por el agonista induce la eliminación del mismo y por tanto, finaliza la señalización de AhR por erradicación del estímulo (Furness et al., 2007). (B) **Modificaciones post-traduccionales:** La fosforilación/defosforilación de AhR participa en el tráfico normal del receptor del citoplasma al núcleo e, incluso, modifica la capacidad del complejo AhR/ARNT para unirse al ADN (Ikuta et al., 2004; Ikuta et al., 2000). Numerosas quinasas como c-src (Backlund y Ingelman-Sundberg, 2005), PKC (proteína quinasa C) (Chen y Tukey, 1996; Long y Perdew, 1999) o las MAP quinasas (proteínas quinasas activadas por mitógeno) p38 y ERK (Chen et al., 2005; Henklová et al., 2008) participan en este proceso. (C) **El represor de AhR:** Uno de los genes diana de AhR, *el represor de AhR* (AHRR, AhR repressor), que se incrementa por exposición a un agonista, codifica para una proteína que presenta homología de secuencia con AhR en la región terminal, pero diverge a partir del dominio PAS A. Esta proteína forma un dímero con ARNT y se une a las secuencias XRE, inhibiendo la acción de AhR y la transcripción de sus genes diana (Baba et al., 2001; Mimura et al., 1999). (D) **Interacción con otras rutas:** AhR interacciona con otras rutas de señalización como la ruta de TGF- β (revisado Gomez-Duran et al., 2009), la del factor de transcripción NF- κ B (Vogel et al., 2011; 2007a; 2007b), la vía del receptor de estrógenos (Ohtake et al., 2007) y la de la proteína retinoblastoma (Elferink et al., 2001; Ge y Elferink, 1998). (E) **Degradación por el proteosoma:** Tras su activación, y una vez finalizada su señal, AhR se transporta al citoplasma gracias a las secuencias de exportación nuclear presentes en el dominio PAS A y bHLH, allí es ubiquitinado y degradado por el proteosoma 26S (Furness et al., 2007; Pollenz, 2002).

De hecho, observaciones relativamente recientes sugieren la implicación de este receptor en funciones fisiológicas. Esta hipótesis se ve reforzada por la presencia de ligandos endógenos para el receptor como se describió en secciones anteriores, el alto grado de conservación de AhR entre especies, la expresión constitutiva de AhR a lo largo del desarrollo, y por último, las alteraciones fenotípicas observadas en los diferentes modelos animales nulos para AhR.

Por tanto, *AhR presenta una dualidad respecto a sus funciones*, apareciendo por un lado como un mediador de la *respuesta adaptativa a los xenobióticos* y, por otro, como mediador de *procesos fisiológicos* durante el desarrollo embrionario así como en el adulto.

1.6.6.1 AhR: Un receptor con un alto grado de conservación

AhR presenta una estructura altamente conservada en vertebrados e invertebrados (Hahn, 2002; Hahn et al., 2006; Walker et al., 2000). Ya que los xenobióticos proceden de manera principal de fuentes antropogénicas, resulta poco probable que la función inicial de AhR fuese mediar el metabolismo de este tipo de compuestos. De hecho, en invertebrados tales como *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*, el ortólogo de AhR interacciona con ARNT y promueve la transcripción de genes diana de manera similar a lo observado en vertebrados pero, a diferencia, es incapaz de responder a xenobióticos como la dioxina y, en su lugar, participa en procesos fisiológicos normales (Butler et al., 2001; Huang et al., 2004; Kim et al., 2006; Qin y Powell-Coffman, 2004). Aunque el TCDD no es capaz de interactuar con el AhR de invertebrados, el receptor puede activarse en ausencia de ligando, o a través de otros ligandos no xenobióticos (Butler et al., 2001; Hahn, 2002; 2006).

Este hecho, apoya la existencia de ligandos endógenos de AhR que activarían al receptor para mediar funciones fisiológicas y el mantenimiento de la homeostasis celular. En base a esto, el papel de AhR en el metabolismo de xenobióticos sería una función adquirida de manera posterior.

1.6.6.2 Expresión constitutiva de AhR durante el desarrollo y en adulto

A lo largo del desarrollo embrionario, la expresión de AhR así como la de sus genes dianas presenta un patrón espacial y temporal concreto (ver revisión (Furness y Whelan, 2009). En el embrión de ratón, AhR y ARNT comienzan a detectarse en los estadios E9-E11 en neuroepitelio y corazón, en la cresta neural derivada de los arcos branquiales 1 y 2 durante los días E9-E11, y en las células de la cresta neural derivadas de la placoda trigeminal durante E11 (Abbott et al., 1995; Abbott y Probst, 1995; Jain et al., 1998). De acuerdo con estas observaciones, la expresión de dos de los principales genes diana de AhR, Cyp1a1 y Cyp1b, se detecta en los días E7 y E11 respectivamente (Choudhary et al., 2003). Concretamente, gracias a la introducción del transgén LacZ bajo el promotor de Cyp1a1 en ratón se observó la expresión de este gen en estructuras que incluían al romboencéfalo, mesencéfalo, corazón y riñones durante los estadios E8-E14 y el hígado, en la piel y en el músculo durante los días E13-E14 (Campbell et al., 2005) (**Figura 1.23**).

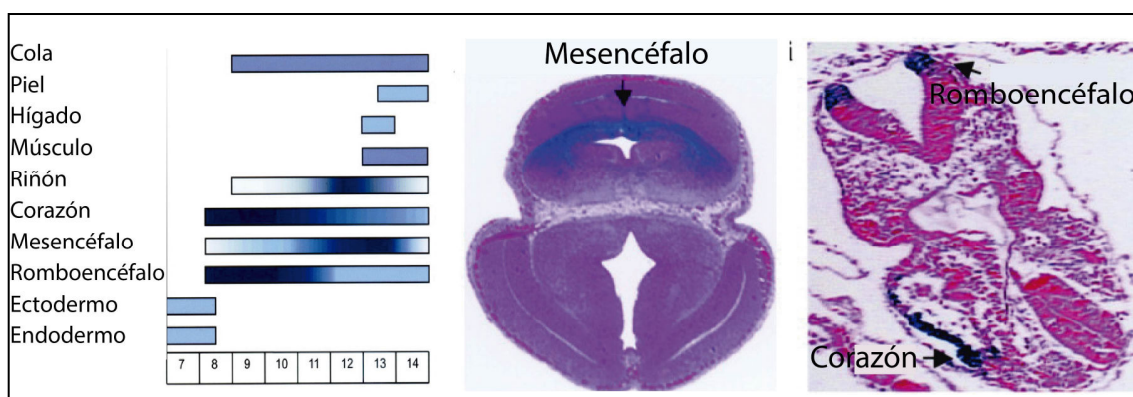


Figura 1.23. Expresión temporal de LacZ bajo el promotor de Cyp1a1 a lo largo del desarrollo (Figura adaptada de Campbell et al., 2005).

Este concreto patrón temporal de expresión durante el desarrollo embrionario de ratón es similar al observado en tejidos embrionarios humanos, en donde además se detecta una fuerte actividad transcripcional de AhR en los pulmones, el hígado y la glándula adrenal (Omiecinski et al., 1990).

Por tanto, la expresión de los principales constituyentes de la vía de señalización de AhR presentan una localización y un patrón temporal concreto de expresión a lo largo del desarrollo embrionario, sugiriendo que la activación de esta ruta se produce en respuesta a estímulos específicos, altamente regulados a lo largo de las distintas fases del desarrollo embrionario.

En el adulto, AhR y sus principales genes diana se expresan de manera constitutiva, pero además, ante determinadas situaciones, su expresión puede inducirse en tipos celulares concretos.

1.6.6.3 Alteraciones fenotípicas en modelos animales nulos para AhR

Quizás las evidencias más importantes que apoyan la implicación de AhR en procesos fisiológicos se han obtenido a partir de la generación de animales nulos para el receptor. De manera independiente, 3 laboratorios generaron ratones nulos para AhR (Fernández-Salguero et al., 1995; Mimura et al., 1997; Schmidt et al., 1996). Aunque todos los modelos presentan importantes características comunes, como ausencia de toxicidad mediada por TCDD, defectos cardiovasculares, disminución del tamaño del hígado, fibrosis portal, fertilidad reducida y alteraciones del sistema inmune, parecen también diferir en algunos aspectos, como son lesiones asociadas a la edad y anomalías en el número de células linfoides (ver revisión de Esser, 2009; Lahvis y Bradfield, 1998). Los defectos fenotípicos encontrados en estos ratones han dilucidado parte de los procesos fisiológicos mediados por AhR.

En la **Tabla 1.7**, pasamos a detallar las características fenotípicas más destacadas en ausencia de AhR y su implicación para la fisiología normal.

Patología general	B6.129 AhR $\Delta 1/\Delta 1F$	B6.129 AhR $\Delta 1/\Delta 1G$	B6.129 AhR $\Delta 2/\Delta 2$
Resistencia a TCDD	Si	Si	Si
Fallo para inducir Cyp1a1, Cyp1a2	Si	Si	Si
Letalidad postnatal	Si	Si	No
Crecimiento retardado	Si	Si	Si
Fertilidad	Reducida	Reducida	Reducida
Patología del hígado	Si	Si	Si
Fallo en el cierre del ductus venoso	No determinado	Si	Si
Defectos cardiovasculares	No determinado	Si	Si
Patología inmune			
Gran tamaño del bazo		Si	No
Poblaciones celulares del timo y del bazo	No determinado	Normales	Normales
Tamaño reducido de las vainas linfoides periarteriales		No	Si

Tabla 1.7. Características fenotípicas observadas en los ratones nulos para AhR (Tabla adaptada de la revisión de Esser et al., 2009). Los ratones nulos para AhR presentan anomalías en diferentes sistemas entre los que se incluyen, el sistema cardiovascular, el sistema reproductivo y el sistema inmune. **Sistema cardiovascular:** Los ratones nulos para AhR presentan un reducido tamaño del hígado (Fernández-Salguero et al., 1995; Schmidt et al., 1996), como consecuencia de defectos en el cierre del ductus venoso (DV) durante el desarrollo. Además, estos ratones también presentan anomalías en la arquitectura de los vasos de los riñones, de los sinusoides del hígado y en los ojos (Lahvis et al., 2000; 2005). De manera adicional, la ausencia de AhR produce una hipertrofia cardíaca, hipertensión, niveles elevados de endotelina-1 y angiotensina-II, una mayor expresión de eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial) y por tanto mayores niveles de NO vascular (Fernández-Salguero et al., 1997; Lund et al., 2003; 2006; 2005; Thackaberry et al., 2002; Zhang et al., 2010a). **Fibrosis portal:** la ausencia del receptor da lugar a fibrosis portal del hígado (Fernández-Salguero et al., 1995; Schmidt et al., 1996). **Sistema reproductivo:** La hembra nula para AhR presenta múltiples defectos a nivel reproductivo que afectan a la concepción, al número de crías, así como a la supervivencia de éstas (Abbott et al., 1999; Baba et al., 2005). AhR es fundamental para la formación y funcionamiento de los folículos ováricos (Baba et al., 2005). Otros aspectos reproductivos en los que AhR parece participar son el desarrollo de la vasculatura uterina comunicante con los tejidos del embrión (Kitajima et al., 2004) y el desarrollo de las glándulas mamarias (Abbott et al., 1999). **Sistema inmune:** Cuando AhR se activa por TCDD, se produce una profunda inhibición de la respuesta inmune humoral y celular, sin embargo, como se observa en la tabla, el fenotipo inmune en los ratones KO para AhR presenta discrepancias. Pese a esto, hoy en día AhR es considerado un importante factor en la modulación del sistema inmune, siendo de hecho, una de las funciones fisiológicas mejor caracterizadas de este receptor (Revisado en Esser et al., 2009; Platten et al., 2012).

1.6.7 Explorando la función de AhR en el cerebro

Aunque AhR se expresa ampliamente en el cerebro en regiones que incluyen la corteza, el hipocampo, el hipotálamo, el cerebelo y el tallo cerebral (Collins et al., 2008; Hays et al., 2002; Lin et al., 2008; Petersen et al., 2000; Powers et al., 2005; Williamson et al., 2005), se sabe extremadamente poco acerca de su función en la fisiología normal del cerebro.

Las primeras evidencias que relacionan a este receptor con el cerebro proceden de invertebrados. Tanto el ortólogo de AhR en *C.elegans* (denominado AHR-1), como el ortólogo de *Drosophila* (denominado *spineless*) juegan un papel esencial en el desarrollo neuronal. En el caso del nematodo, *AHR-1* participa en la diferenciación de las neuronas GABAérgicas, en procesos de migración neuronal durante el desarrollo, así como en los hábitos alimenticios de *C. elegans* mediante la modulación de distintos tipos neuronales (Huang et al., 2004; Qin y Powell-Coffman, 2004; Qin et al., 2006). En *Drosophila melanogaster*, *spineless* es un factor clave en la diversificación de la morfología neuronal y, por tanto, en su función, en la arborización dendrítica y en el desarrollo del sistema nervioso periférico (Kim et al., 2006).

En mamíferos, la expresión de AhR en el cerebro se detecta en distintos tipos celulares que incluyen principalmente neuronas, astrocitos y células endoteliales cerebrales (Filbrandt et al., 2004; Khanna et al., 2013; Lin et al., 2008; 2009). De manera similar a lo observado en *C.elegans*, los ratones nulos para AhR presentan una disrupción en la diferenciación de las neuronas GABAérgicas durante el desarrollo embrionario en el telencéfalo ventral (Collins et al., 2008). Aunque la mayor parte de los estudios realizados sobre la función de AhR en el cerebro se centran en evaluar los efectos tóxicos por exposición a TCDD, existen estudios recientes que muestran la participación de

AhR en la neurogénesis adulta hipocampal (Latchney et al., 2012), la implicación del receptor en el nistagmo de tipo horizontal como consecuencia de un defectivo funcionamiento del sistema nervioso central (Chevallier et al., 2013), y la generación de tumores cerebrales a través del eje TDO-LKyn-AhR (Opitz et al., 2011).

Por otro lado, diferentes estudios epidemiológicos o toxicológicos realizados en humanos y animales muestran cómo la activación de AhR por ligandos xenobióticos durante el periodo prenatal induce neurotoxicidad que se manifiesta con cambios en la neurogénesis, el dimorfismo sexual cerebral, la capacidad de aprendizaje, el comportamiento social, así como en enfermedades de tipo psiquiátrico (Gassmann et al., 2010; Goetz et al., 1994; Ikeda et al., 2005; Nishijo et al., 2007; Patandin et al., 1998; 1999; Piedrafita et al., 2008; Tanida et al., 2013).

Además, AhR se ha implicado en mediar procesos de toxicidad y apoptosis en distintos tipos neuronales (Kajta et al., 2009; Lin et al., 2008; 2009; Sánchez-Martín et al., 2010, 2011). La dioxina y otros agonistas de AhR se caracterizan por mediar un rápido incremento de la concentración de calcio intracelular (Dale y Eltom, 2006; Hanneman et al., 1996; Kim y Yang, 2005; Wong et al., 1997; Zhao et al., 2005). En neuronas, mediante el bloqueo de los receptores NMDA se consigue frenar esta entrada masiva de Ca^{2+} , así como la producción de ROS inducida por el TCDD (Kim y Yang, 2005), delineando una posible implicación de los receptores NMDA en la neurotoxicidad inducida por la activación de AhR.

De hecho, el papel de AhR en procesos de excitotoxicidad ha sido objeto de estudio por el grupo de Wang y colaboradores (Lin et al., 2008; 2009). De manera inicial, demostraron cómo la regulación génica neuronal mediada por AhR es un proceso dependiente de la actividad de la propia neurona, haciendo

a unas neuronas más susceptibles que a otras a la toxicidad mediada por TCDD. Este mecanismo dependía de manera directa de los receptores NMDA así como de la vía CaMKII. Posteriormente observaron que AhR, mediante la regulación a nivel transcripcional de las subunidades de los receptores NMDA, participa en la respuesta dual de supervivencia y muerte mediada por dichos receptores. En ese contexto, la activación del receptor mediante TCDD promovía excitotoxicidad y reducía las rutas de supervivencia asociadas a los mismos, como la de la neurotrofina BDNF.

Hasta la fecha, no existen estudios *in vivo* que evalúen el papel de AhR en el funcionamiento del cerebro adulto en un contexto patológico como es el caso de la isquemia cerebral. Ya que la excitotoxicidad es uno de los procesos principales responsables de la muerte neuronal, y dadas las evidencias que demuestran la participación de AhR en toxicidad neuronal en otros contextos, la posible implicación de AhR en el proceso excitotóxico tras el ictus isquémico abriría nuevas puertas para futuras intervenciones terapéuticas.

The background of the slide features a large, semi-transparent white number '2' centered behind a faint world map. The map is rendered in a light beige or tan color, showing the outlines of continents and major landmasses. The overall aesthetic is clean and academic.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

La activación por ligando del receptor para hidrocarburos de arilo (AhR) en la fase aguda de la isquemia cerebral tiene un efecto deletéreo, que es mediado, en parte, por su participación en el proceso de excitotoxicidad.

2.2 OBJETIVOS

Los objetivos planteados para demostrar la hipótesis son:

2.2.1 Estudio del receptor AhR en modelos experimentales de isquemia cerebral

Dentro de este objetivo se incluyen los siguientes subobjetivos:

1. Análisis de la expresión de AhR en modelos de isquemia cerebral experimental *in vivo* e *in vitro*.
2. Estudio de la activación de AhR en modelos de isquemia cerebral experimental *in vivo* e *in vitro*.
3. Estudio de la pérdida de función de AhR en modelos de isquemia cerebral experimental *in vivo* e *in vitro*, sobre el volumen de infarto y síntomas sensorimotrices, y sobre la viabilidad tras privación de oxígeno y glucosa o exposición a NMDA.

2.2.2 Evaluación de L-kinurenina como ligando endógeno de AhR en modelos experimentales de isquemia cerebral

Dentro de este objetivo se incluyen los siguientes subobjetivos:

1. Análisis temporal de la concentración cerebral y plasmática de L-triptófano y L-kinurenina en un modelo de isquemia experimental *in vivo*.
2. Análisis de la expresión cerebral de las enzimas encargadas de la generación de L-kinurenina en un modelo de isquemia experimental *in vivo*.

3. Estudio del efecto de L-kinurenina en modelos experimentales de isquemia cerebral *in vivo* e *in vitro*. Efecto sobre:

- La activación del receptor AhR por L-kinurenina (*in vivo* e *in vitro*).
- La viabilidad tras OGD o NMDA y su dependencia de AhR (*in vitro*).
- El volumen de infarto tras pMCAO y su dependencia de AhR (*in vivo*).

4. Estudio del efecto de un inhibidor de la enzima triptófano-2,3- dioxigenasa en modelos experimentales de isquemia cerebral *in vivo* e *in vitro*. Efecto sobre:

- La activación del receptor AhR (*in vivo* e *in vitro*).
- El volumen de infarto tras pMCAO (*in vivo*).

2.2.3 Estudio de los mecanismos AhR dependientes implicados en el daño cerebral en fase aguda en modelos experimentales de isquemia *in vivo* e *in vitro*

1. Estudios *in vitro* de la pérdida de función de AhR y de su activación por L-kinurenina tras la exposición a OGD o NMDA. Efecto sobre:

- La concentración de Ca²⁺ intracelular.
- La expresión de las subunidades de los receptores NMDA.
- La fosforilación del factor de transcripción CREB.
- La expresión de las proteínas MAGUKs.
- La interacción de AhR con CBP/CREB y la modulación de los genes diana de CREB.

2. Estudios *in vivo* de la pérdida de función de AhR tras pMCAO. Efecto sobre:

- La expresión de las subunidades de los receptores NMDA.
- La fosforilación del factor de transcripción CREB.
- La expresión de las proteínas MAGUKs.
- La interacción de Sap102 y AhR.
- La interacción de AhR con CBP/CREB y la modulación de la ruta de CREB.

The image shows the front cover of a book. The background is a light beige or cream color with a complex, organic marbled pattern in shades of brown, tan, and grey. A large, stylized white number '2' is centered on the cover, with a subtle drop shadow. The title 'MATERIALES Y MÉTODOS' is printed in a dark brown, serif font, centered horizontally and partially overlaid by the number '2'.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

Para nuestro estudio empleamos los siguientes compuestos:

- Como antagonistas de AhR se emplearon, el antagonista selectivo 6,2',4'-trimetoxiflavona (Tocris Bioscience) (Murray et al., 2010a), y el antagonista CH-223191 (Tocris Bioscience) (Zhao et al., 2010).
- Como agonista de AhR se utilizó 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*P*-dioxina (TCDD), (AccuStandard) (Niwa et al., 1975) y la L-kinurenina (Tocris Bioscience) (Opitz et al., 2011).
- Como inhibidor de la enzima triptófano-2,3-dioxigenasa se utilizó el compuesto 680C91 (Tocris Bioscience) (Salter et al., 1995).
- Como agonista prototípico de los receptores NMDA (ácido-N-metil-D-aspartico) se utilizó NMDA (Tocris Bioscience).
- Como antagonista competitivo NMDA, se utilizó el compuesto D-AP5 (D-(-)-2-amino-5-ácido fosfopentanoico) (Tocris Biosciences).

3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL IN VIVO

3.2.1 Normativa y animales de experimentación

Todos los protocolos experimentales se rigieron bajo las guías de experimentación animal del Comité de la Universidad Complutense de Madrid (directivas de la UE 86/609/CEE y 2003/65/CE). Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de temperatura y humedad, libre acceso a comida y agua, y ciclo de luz/oscuridad de doce horas (comenzando el periodo de luz a las 07:00 horas).

Se utilizaron ratones macho adultos C57BL/6J de 8 a 12 semanas de edad obtenidos de los laboratorios Harlan. Estos ratones presentan el alelo del tipo AhR^b (Chang et al., 1993) el cual es capaz de responder a ligandos de AhR, a diferencia del alelo AhR^d encontrado en otras cepas de ratón como la cepa DBA/2 y la cepa Sv/129. Adicionalmente, se utilizó un grupo de ratones deficientes (AhR^{-/-}) y ratones haploinsuficientes (AhR^{+/-}) para el receptor AhR (ratones cedidos por el profesor Fernández-Salguero, Departamento de Bioquímica y Biología molecular de la Universidad de Extremadura) en los que la secuencia codificante del exón 1 ha sido sustituida por un casete de neomicina (Fernández-Salguero et al., 1995). Tanto los ratones salvajes AhR^{+/+} (utilizados como controles) como los ratones nulos y heterocigotos para AhR se generaron a partir del cruce de ratones AhR^{+/-}. Estos ratones se mantuvieron en un fondo genético C57BL/6J. El genotipo de los ratones se analizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) empleando ADN genómico obtenido de la biopsia de la cola. La extracción del ADN genómico se realizó digiriendo un pequeño fragmento de cola en tampón de lisis (100 mM de NaCl, 10 mM de EDTA, 0,5% de SDS y 10 mM Tris pH8) con proteinasa K (0,1 mg/ml) (Sigma Aldrich) durante 16h a 55°C y sometido posteriormente a una extracción con fenol/cloroformo/isoamilo (Invitrogen) y precipitación con etanol y acetato de sodio. Finalmente, el ADN se dejó secar y se resuspendió en 100 µl de tampón TE (10 mM de EDTA, y 10 mM Tris pH 8), de los cuales 2 µl (~100 ng de ADN genómico) fueron utilizados como molde para la PCR. Los cebadores utilizados en la reacción de PCR son: 5'-GGCTAGCGTGCGGGTTTCTC-3' y 5'-CTAGAACGGCACTAGGTAGGTCAG A-3'. Estos cebadores hibridan con secuencias de ADN genómico localizadas hacia los extremos 5' y 3' del lugar en el que se realizó la inserción del gen de resistencia a neomicina en el alelo mutado del AhR (Fernández-Salguero et al., 1995). De este modo, se obtiene un fragmento de PCR de 1.5 Kb en el caso del

alelo mutado y de 0.5 Kb cuando se trata del alelo salvaje. En el caso de los animales heterocigotos se obtienen ambos alelos.

3.2.2 Modelo de isquemia experimental por oclusión permanente de la arteria cerebral media (pMCAO)

El modelo de isquemia cerebral utilizado en esta Tesis doctoral consiste en la oclusión permanente de la arteria carótida común (ACC) y de la arteria cerebral media (ACM) izquierdas mediante ligadura. Este procedimiento quirúrgico es una variante del modelo descrito por Chen y colaboradores (Chen et al., 1986). La elección del modelo permanente se ha realizado en base a su relevancia clínica en comparación con los modelos experimentales de oclusión mecánica transitoria (ver revisiones de Hossmann, 2009, 2012).

Para llevar a cabo dicho procedimiento, los animales se introdujeron en una cámara de inducción de anestesia con una mezcla de oxígeno/aire comprimido (0,2/0,8 L/min) e isofluorano al 1,5-2% durante 5 minutos. Durante la cirugía, la anestesia se mantuvo al 1,5-2% de isofluorano y con igual mezcla de oxígeno/aire comprimido. La temperatura corporal se controló con una sonda de temperatura rectal, y se mantuvo a $36,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ usando una manta emisora de calor sobre la cual se coloca al animal.

La ligadura de la arteria carótida común izquierda se realizó mediante una incisión en la línea media cervical, para proceder después a la disección y ligadura con una seda 6/0 de dicha arteria. Posteriormente, se realizó una incisión desde el canto lateral del ojo izquierdo y el canal auditivo externo para exponer y retraer el músculo temporal. Tras una pequeña craneotomía (2mm) a nivel del tronco de la arteria cerebral media izquierda y sobre la fisura rinal, se expuso dicha arteria, que se ligó de forma permanente a nivel del tronco en su región distal (**Figura 3.1 A**), justo antes de su bifurcación en las ramas frontal y parietal con una sutura monofilamento de 9/0 (Nylon, S&T).

La interrupción del flujo sanguíneo se confirmó bajo el microscopio quirúrgico (WILD M650). El grupo de animales sham se sometió a la anestesia y al procedimiento quirúrgico pero sin la oclusión de las arterias. La oclusión de la arteria cerebral media en su porción distal genera infartos de tipo cortical que afectan principalmente a la corteza somatosensorial (**Figura 3.1, B**).

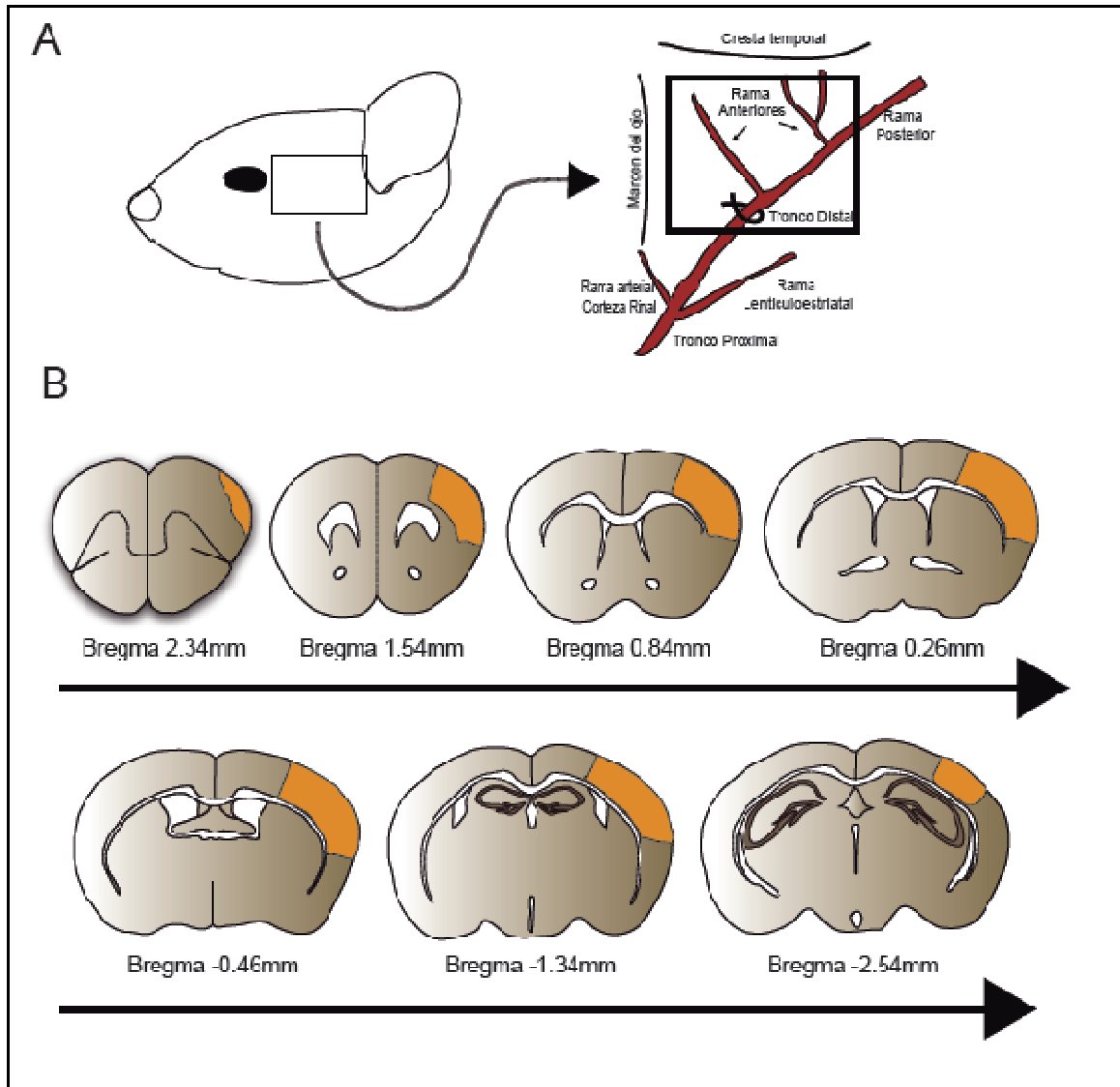


Figura 3.1. Modelo de oclusión permanente de la arteria cerebral media en ratón. (A) Estructura de la ACM en su región proximal y distal. (B) Lesión representativa (amarillo) desde su parte anterior a posterior producida por la oclusión de la ACM en su región distal, que afecta de manera mayoritaria a la corteza somatosensorial (Ver Franklin y Paxinos, 2007).

3.2.3 Evaluación del volumen de infarto

3.2.3.1 Tinción con TTC (cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio)

24 y 48 horas después de la pMCAO, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajeron los cerebros. Con ayuda de una matriz para cerebro de ratón (Brain Matrix), se realizaron secciones coronales de 1mm de grosor tras lo cual se tiñeron durante 20 minutos a temperatura ambiente con TTC (Cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio) al 2% (Merck Bioscience) en tampón fosfato 0,2M. El TTC es una sal de tetrazolio que tiene la capacidad de ser reducido por la cadena respiratoria mitocondrial de forma que cambia de incoloro a rojo (Bederson et al., 1986). La zona infartada, al carecer de actividad mitocondrial debido a la muerte celular, no podrá reducir este compuesto y presentará coloración blanca. Cada sección se fotografió con una cámara digital (Nikon Coolpix 990, Nikon Corporation) y cada imagen se analizó contando el número de píxeles en las zonas seleccionadas. Para el análisis de las imágenes y transformación de píxeles a milímetros cuadrados se empleó el software ImageJ 1,33u (NIH). Se realizaron medidas del hemisferio ipsilateral, del hemisferio contralateral así como de la zona infartada. Para obtener el volumen de infarto (expresado en mm³) y el % de hemisferio infartado (HI) se utilizó la fórmula que aparece en la **Figura 3.2**.

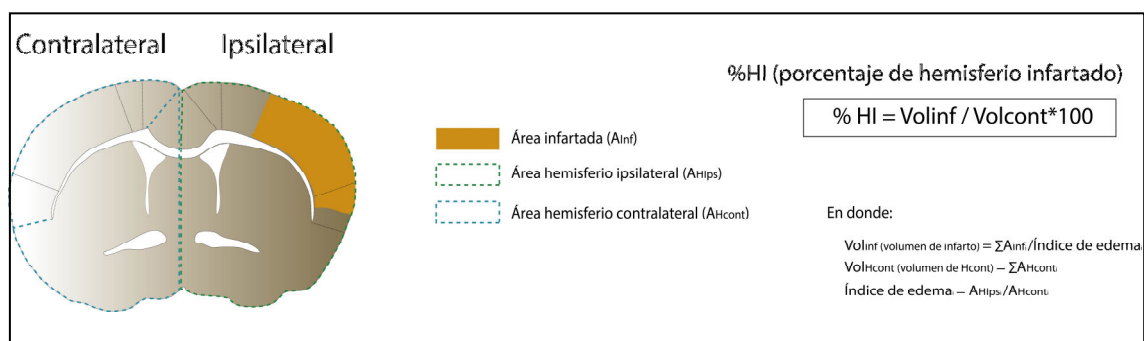


Figura 3.2. Medidas y fórmula utilizada para el cálculo del volumen del infarto expresado como % de hemisferio infartado. La división del área infartada por el índice de edema solo se lleva a cabo si dicho índice es mayor a 1.

3.2.3.2 Tinción de Nissl mediante violeta de cresilo

Para realizar la tinción histológica de Nissl se utilizaron 9 secciones coronales de cerebro de ratón con una fracción de muestreo de 1/20 (secciones de 30 μm , distancia de 600 μm), que incluyen desde bregma 1,78mm a bregma -3,64mm. Estas secciones se montaron en portaobjetos superfrost (Thermo Scientific), se secaron, se hidrataron en agua destilada y se tiñeron mediante una solución de acetato de violeta de cresilo (Sigma Aldrich) al 0,5%. Una vez teñidas, las muestras se sometieron para su deshidratación a una gradación creciente de alcoholes (75%, 90% y 100% etanol), posteriormente se sumergieron en xileno (Sigma Aldrich) y finalmente se montaron en medio de montaje DPX (Sigma Aldrich). La tinción de Nissl permite la visualización del infarto como un área hipocromática en la corteza ipsilateral, indicativa del daño neuronal. El análisis en detalle permite, de manera adicional, la visualización de cambios morfológicos celulares como la disminución de tamaño, la condensación nuclear y aspecto triangular en comparación con la corteza contralateral (**Figura 3.3**).

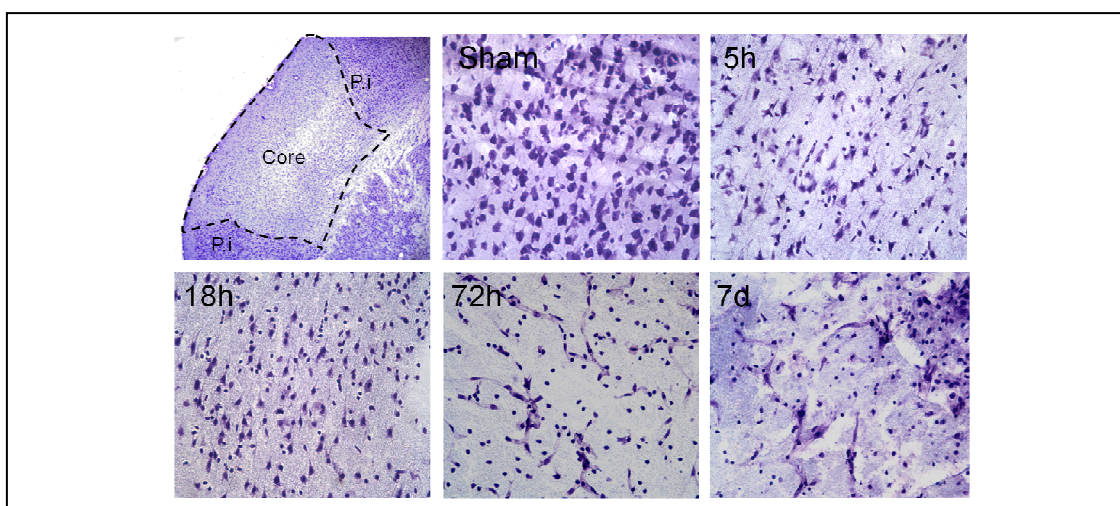


Figura 3.3. Secciones coronales de cerebro de ratón teñidas mediante violeta de cresilo. La imagen superior de la izquierda muestra la región hipocromática que se corresponde a la zona infartada o “core”. En esa fotografía se señalan también las regiones de peri-infarto, marcadas como p.i. El resto de imágenes muestran los cambios morfológicos observados en la región de “core” a distintos tiempos tras pMCAO.

La medida del volumen de infarto se realizó mediante la estimación por Cavalieri (Michel y Cruz-Orive, 1988), utilizando un microscopio óptico (Nikon Eclipse 80i Nikon Corporation) acoplado al software StereoInvestigator 6 (MicroBrightfield Inc.). La estimación de los volúmenes se realizó con un coeficiente de error medio para la estimación menor de 0,05 (Gundersen, $m=0,01$). La medida del % de hemisferio infartado se calculó según la fórmula descrita en la **Figura 3.2**.

3.2.3.3 Resonancia magnética

Para algunos estudios de neuroprotección se realizó un análisis del volumen del infarto por RMN (resonancia magnética) 24h después de la MCAO. Para dicho análisis, nos servimos del equipo Biospec BMT 47/40 con un campo de 4,7 Teslas, que permite la obtención de imágenes de resonancia magnética *in vivo* y que, junto con el software de imagen ParaVision, permiten la adquisición y reconstrucción de imágenes y el procesado de los datos obtenidos. Una vez adquiridas las imágenes, nos servimos del software ImageJ 1,33u (NIH), y mediante su aplicación *MRI analysis calculator* determinamos los volúmenes de hemisferio infartado en los distintos grupos mediante la fórmula descrita en la **Figura 3.2**.

Para dichas medidas empleamos 17 cortes separados 450 micras entre sí desde bregma 1.78mm a bregma -3.64mm. La conversión de las medidas obtenidas con el *MRI analysis calculator* a unidades de volumen (mm^3) para su introducción en la fórmula de %*Hemisferio Infartado* se consiguió aplicando las siguientes formulas:

$$\text{Resolución en el Plano} = \text{Vol MRI analysis calculator} \times 0,098 \times 0,098$$

$$\text{Resolución en Volumen} = \text{Resolución Plano} \times 0,391$$

3.2.4 Evaluación neurológica

3.2.4.1 Escala mNSS (*modified Neurological Severity Score*)

A todos los animales se les aplicó la escala mNSS (Chen et al., 2001) 48 horas después de la cirugía. La función neurológica se evalúa en una escala del 0 al 14 (0, puntuación normal; 14, puntuación de déficit máximo, o mayor daño). La escala mNSS evalúa las posibles alteraciones de tipo motor y sensitivo, así como reflejos y equilibrio tras una isquemia cerebral (**Tabla 3.1**).

Parámetro a evaluar	Puntuación
Levantar al ratón de la cola por 30s (Hemiplejía) Flexión de extremidad anterior Flexión de Extremidad posterior La cabeza se mueve >10° en el eje vertical en los 30s	0-3 1 1 1
Poner al ratón en el suelo (Marcha) Marcha normal Incapacidad para una marcha recta o derecho Marcha en círculos hacia el lado parético Se cae sobre el lado parético	0-3 0 1 1 1
Beam Balance (Equilibrio) Se balancea con postura estable >60s Agarra un lado de la barra Abraza la barra y se suelta una extremidad Abraza la barra y se sueltan dos extremidades o da una vuelta (>30s) Intenta balancearse pero cae (>20s) intenta balancearse pero cae (>10s) Cae sin intentos de balanceo o agarre (<10s)	0-6 0 1 1 1 1 1 1
Reflejos Pinna (sacude la cabeza al tocar el meato auditivo con un algodón) Corneal (no parpadea cuando la cornea es ligeramente tocada con un algodón)	0-2 1 1
Puntuación total	0-14

Tabla 3.1. Parámetros evaluados en la escala mNSS para determinar el déficit neurológico tras pMCAO. La puntuación total del ensayo son 14 puntos (déficit máximo) (Chen et al., 2001).

3.2.4.2 El “Grip Test”

El “grip test” es un método no invasivo, utilizado de manera rutinaria en ratón, que evalúa la fuerza de las patas delanteras o traseras. El ensayo se llevó a cabo según lo descrito previamente (revisado en Brooks y Dunnett, 2009; Peled-Kamar et al., 1997) con algunas modificaciones. Para ello, los ratones se sujetaron por la cola, permitiéndoles agarrarse con sus patas delanteras a una barra horizontal de 2mm de grosor situada a 80 cm del suelo. El ensayo tuvo una duración de 2 minutos, en los que se registró el tiempo de latencia que el animal tarda en caer.

Los animales fueron sometidos 3 veces al ensayo en intervalos de 30 minutos. El tiempo que el animal tarda en caer se expresó como promedio de las tres repeticiones.

3.2.5 Grupos experimentales y tratamientos

3.2.5.1 *Grupo Experimental I: Curso temporal de AhR y metabolitos de la ruta de las kinureninas tras pMCAO*

El esquema de la administración del tratamiento, sacrificio y recogida de muestras se esquematiza en la **Figura 3.4**.

- **Sham + Veh:** animales sometidos a la exposición de la arteria carótida común izquierda y de la arteria cerebral media sin ligadura y administración intraperitoneal (i.p). de vehículo (DMSO al 100%) 10 minutos después de la cirugía.
- **pMCAO + Veh:** animales sometidos a pMCAO a los que se les administró vehículo i.p. (DMSO al 100%) 10 minutos después de la cirugía.

La adquisición de muestras se realizó a 5h, 18h, 24h, 48h, 72h y 7días post-MCAO. Se generaron distintos grupos para el análisis de la expresión proteica

de AhR mediante western blot, para el análisis de la expresión a nivel de ARNm de AhR por RT-PCR, para el análisis por inmunofluorescencia de la localización de AhR en el cerebro y para el aislamiento de núcleos y citosoles y posterior evaluación de la traslocación nuclear de AhR.

Adicionalmente, para llevar a cabo el análisis de la ruta de las kinureninas, se utilizó un grupo de animales que fueron sacrificados a 3h, 5h, 8h, 16h, 24h y 48h post-MCAO. De este grupo de animales se extrajo la zona infartada + peri-infarto y plasma para la determinación de kinureninas.

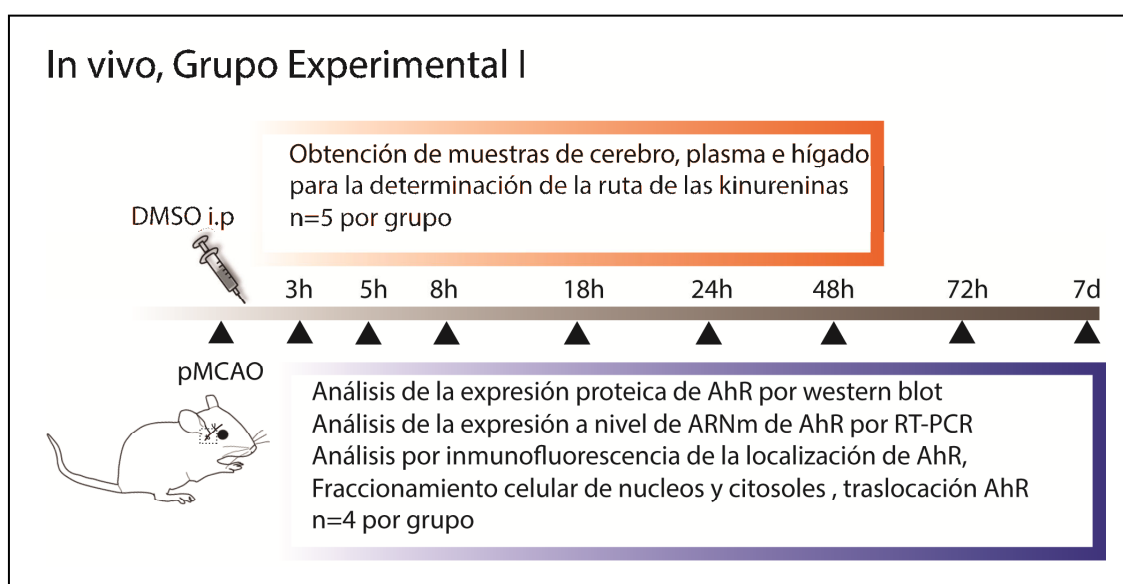


Figura 3.4. Grupos experimentales diseñados para el análisis temporal de parámetros moleculares como la expresión de AhR tras el daño isquémico y los niveles de metabolitos de la ruta de las kinureninas.

3.2.5.2. Grupo Experimental II: Evaluación del volumen de infarto, déficits neurológicos y parámetros moleculares, en ratones tratados con antagonistas de AhR

El esquema de la administración del tratamiento, sacrificio y recogida de muestras se esquematiza en la **Figura 3.5**.

• **Grupo de animales Sham:** Animales sometidos a la exposición de la arteria carótida común izquierda y de la arteria cerebral media sin ligadura y

administración i.p. de vehículo (DMSO al 100%) o 6,2',4'-trimetoxiflavona (TMF) 5 mg/Kg (DMSO al 100%) 10 minutos después de la cirugía.

• **Grupo de animales pMCAO:** Animales sometidos a pMCAO y tratados i.p. con vehículo (DMSO al 100%), TMF 5 mg/Kg (DMSO al 100%), CH223391 5 mg/Kg (DMSO al 100%) o CH223391 10 mg/Kg (DMSO al 100%) 10 minutos después de la cirugía.

Para determinar el volumen de infarto, el déficit neurológico y los cambios a nivel proteico, los animales fueron sacrificados 24h y 48h post-isquemia.

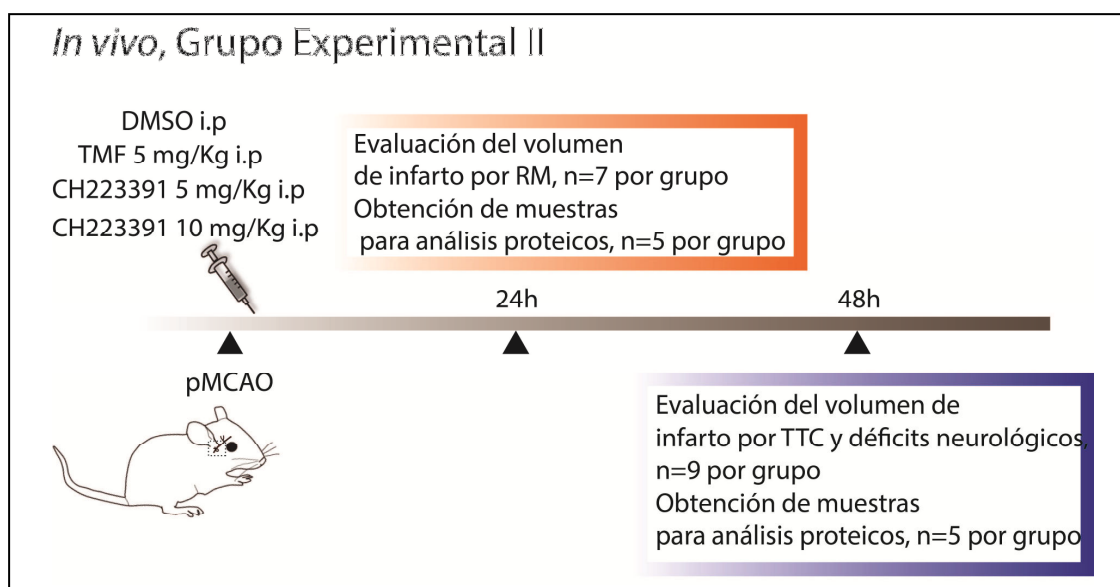


Figura 3.5. Grupos experimentales para evaluar el efecto del tratamiento con antagonistas de AhR en el volumen de infarto y déficits neurológicos, así como para la evaluación de parámetros moleculares

3.2.5.3. Grupo Experimental III: Evaluación del volumen de infarto, déficit neurológico y parámetros moleculares en los ratones $AhR^{+/+}$, $AhR^{+/-}$ y $AhR^{-/-}$

El esquema de la administración del tratamiento, sacrificio y recogida de muestras se esquematiza en la Figura 3.6.

• **Grupo de animales Sham:** Animales salvajes (WT, $AhR^{+/+}$) y heterocigotos ($AhR^{+/-}$) para AhR sometidos a la exposición de la arteria carótida común izquierda y de la arteria cerebral media sin ligadura.

- **Grupo de animales pMCAO:** Animales salvajes ($AhR^{+/+}$), heterocigotos ($AhR^{+/-}$) y nulos ($AhR^{-/-}$) para AhR sometidos a pMCAO.

Para determinar el volumen de infarto y déficits neurológicos los animales fueron sacrificados 48h post-isquemia. En los estudios de análisis del ARNm, los animales fueron sacrificados 16h post-isquemia. Para la determinación de cambios a nivel proteico, los animales se sacrificaron 24 y 48h post-isquemia. Los estudios de inmunofluorescencia se realizaron 24h post-isquemia.

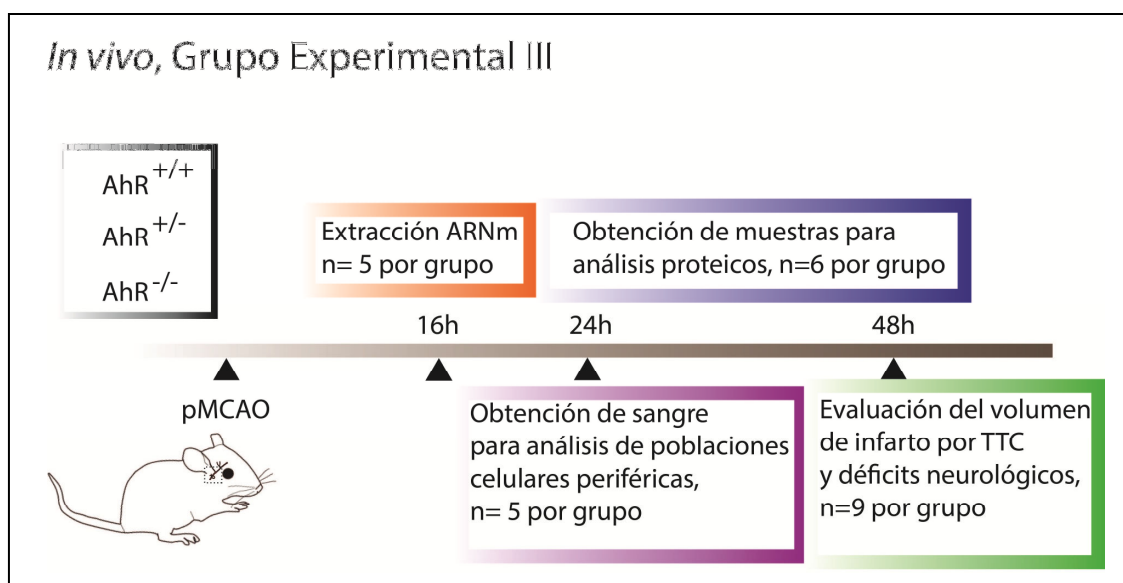


Figura 3.6. Grupos experimentales para evaluar el volumen de infarto y el déficit neurológico en ratones WT, heterocigotos y deficientes para AhR, así como diferentes parámetros moleculares.

3.2.5.4. Grupo Experimental IV: Evaluación del volumen de infarto tras el tratamiento con L-kinurenina y el inhibidor de la enzima triptófano-2,3-dioxigenasa

El esquema de la administración del tratamiento, sacrificio y recogida de muestras se esquematiza en la **Figura 3.7**.

- **Grupo de animales pMCAO:** Animales sometidos a pMCAO a los que se les administró i.p. vehículo (DMSO al 100%), TMF 5 mg/Kg, (L-Kyn) 10 mg/Kg, TMF 5 mg/Kg y L-Kyn 5 mg/Kg o 680C91 10 mg/Kg, 10 minutos después de la

cirugía. Adicionalmente, se creó un nuevo grupo de animales que se trataron 10 minutos y 7 horas tras pMCAO con el inhibidor 680C91 a la dosis de 10 mg/Kg.

El volumen de infarto se evaluó 24h post MCAO por RM y 48h mediante TTC. Adicionalmente, los animales fueron sacrificados 4 y 24 horas post-isquemia para el aislamiento de núcleos y citoplasmas.

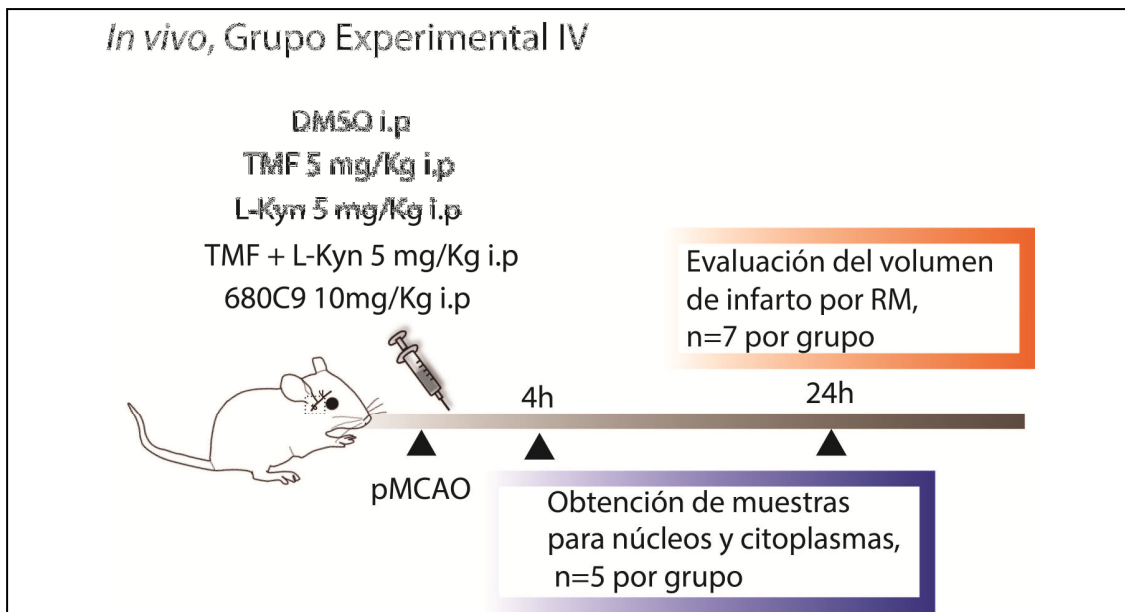


Figura 3.7. Grupos experimentales diseñados para evaluar el volumen de infarto tras el tratamiento con L-kinurenina, así como el efecto del tratamiento combinado con L-kinurenina + TMF. De manera adicional, se evaluó el volumen de infarto en ratones tratados con el inhibidor de la enzima TDO, en dosis única, o mediante la administración de 2 dosis a los 10 minutos y a las 7 horas tras pMCAO.

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL IN VITRO

3.3.1 Cultivos primarios de neuronas corticales de rata

Los cultivos primarios de neuronas corticales de rata se realizaron según lo descrito previamente (Hurtado et al., 2002). Para estos cultivos, se utilizaron ratas Wistar (Harlan). Estas ratas se caracterizan por presentar 2 alelos distintos para AhR que generan proteínas de 100 y 97 KDa, siendo ambos alelos capaces de responder por igual a ligandos de AhR (Jiang et al., 2009). Para llevar a cabo el cultivo, se utilizaron cerebros de fetos de rata en el día embrionario 16 (E16) a

los que se les extrajeron las cortezas, que se disociaron mecánicamente en un medio de incubación básico (BME, *Basal medium Eagle*) suplementado con glucosa (33 mM), glutamina (2mM), gentamicina (16 mg/l), suero de caballo (HS, 10%) y suero bovino fetal (SFB, 10%) (*medio de crecimiento*). Una vez disociadas, las células se sembraron a una densidad de 3×10^5 células/cm³ en placas de 6, 12, 24 o 96 pocillos previamente tratadas con poli-L-lisina (Sigma) para facilitar su adhesión. Las placas se mantuvieron a 37°C, en atmósfera húmeda compuesta por 95% de O₂ y 5% de CO₂.

En el día 4 de cultivo, el medio se reemplazó por *medio de crecimiento* fresco sin SFB, al que se le añade citosina β -D-arabinofuranósido (10 μ M; Sigma Aldrich). Este compuesto se incorpora al ADN e inhibe su replicación, por lo que resulta efectivo para inhibir la presencia de células no neuronales en los cultivos puros de neuronas. Tres días después, el *medio de crecimiento* fue sustituido por *medio normal*, que es similar al *medio de crecimiento*, pero carece de suero fetal y de citosina β -D-arabinofuranósido. Los experimentos se llevaron a cabo entre los días *in vitro* (DIV) 12 y 14. En este momento, el porcentaje de neuronas en el cultivo puro de neuronas de rata se encuentra en $94 \pm 6\%$, según lo descrito previamente (Romera et al., 2004).

3.3.2 Inducción de isquemia *in vitro* por privación de oxígeno y glucosa

La exposición de cultivos primarios de neuronas de rata a privación de oxígeno y glucosa (OGD, *oxygen/glucose deprivation*), se llevó a cabo según lo descrito (De Cristóbal et al., 2002; Hurtado et al., 2002). Con este fin, el medio de cultivo normal se reemplazó por el medio de isquemia compuesto por NaCl (130 mM), KCl (5,4 mM), CaCl₂ (1,8 mM), NaHCO₃ (26 mM), MgCl₂ (0,8 mM), NaH₂PO₄ (1,18) y HS (2%) el cual fue previamente equilibrado en una atmósfera con 95% N₂ y 5% CO₂ a 37°C. Posteriormente las placas se introdujeron en una cámara

anaeróbica (Forma Scientific), que contiene una mezcla de 95% de N₂ y 5% de CO₂, humidificada a 37° y a una presión constante de 0,15 bar. El tiempo de exposición a la OGD fue de 150 minutos. Este tiempo fue seleccionado en base a previos experimentos tiempo-respuesta del grupo (De Cristóbal et al., 2002), en los que se observó que la liberación abrupta de glutamato por las células a consecuencia de la OGD se inicia después de 140-160 minutos de exposición. Este efecto va seguido (10 minutos después) de la lisis celular, que se caracteriza por la liberación de los componentes citosólicos entre los que se encuentra la lactato deshidrogenasa (LDH) y el glutamato (liberación secundaria de glutamato procedente de las células lisadas).

Transcurrido este tiempo, la OGD se finalizó sustituyendo el *medio de isquemia* por medio BME oxigenado suplementado con glucosa (0,6%), glutamina (0,29%), penicilina (50 IU/ml), estreptomicina (50µg/ml) y HS (10%) (*medio de reperfusión*) y las neuronas fueron devueltas al incubador en condiciones de normoxia (95% aire y 5% de CO₂ a 37°C) . En paralelo, se realizó el mismo procedimiento en el grupo control. Para ello, las neuronas se sometieron a una solución idéntica al *medio de isquemia* pero oxigenada y suplementada con glucosa (33 mM) (*medio de isquemia control*). Durante los 150 minutos de OGD, estas neuronas control se mantuvieron en condiciones de normoxia. Una vez finalizado el tiempo de OGD, el medio de isquemia control se reemplazó por *medio de reperfusión* y las neuronas se devolvieron al incubador en condiciones de normoxia.

3.3.3 Excitotoxicidad mediada por NMDA

Para el ensayo de la excitotoxicidad producida por NMDA, se procedió según lo descrito previamente (Liu et al., 2007; Nicolai et al., 2010). Para ello, se retiró el medio de los cultivos primarios de neuronas y se realizaron dos lavados con PBS (Gibco). Posteriormente, las neuronas se incubaron con una *solución libre de*

magnesio compuesta por NaCl (157mM), KCl (5mM), KH₂PO₄ (0,64mM), NaHCO₃ (3mM), glucosa (5mM), HEPES (20mM), Na₂HPO₄ (0,33mM) y CaCl₂ (2mM) y se trataron durante 20 minutos a 37° con NMDA (100 µM) y glicina (10µM). Una vez transcurridos los 20 minutos, se realizó un lavado con PBS y las células se devolvieron a su medio de cultivo normal.

3.3.4 Medida de la viabilidad celular por la actividad enzimática de la enzima LDH (lactato deshidrogenasa)

La viabilidad celular de los cultivos neuronales tras la OGD o tras la excitotoxicidad mediada por los receptores NMDA y los distintos tipos de tratamientos se estudió mediante la medida de la actividad enzimática de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), una enzima citosólica estable que es liberada al medio de cultivo como consecuencia de la lisis celular. Para tal efecto, se tomaron medio de cultivo y células lisadas mediante PBS – Tritón al 0,1% durante 30 minutos a 37°C, 24 horas después del periodo de OGD o del tratamiento con NMDA, y la actividad se evaluó mediante el kit comercial CytoTox96® Non-Radioactive Cytotoxicity (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante. La actividad de la LDH se determinó espectrofotométricamente a 340nm, siguiendo la oxidación del NADH (disminución en la absorbancia) en presencia de piruvato (Koh y Choi, 1987) mediante el lector de placas TECAN. La liberación de la LDH se expresó como el porcentaje de la LDH celular total y se representó como el porcentaje de liberación de la LDH inducida por la OGD. La liberación basal de la LDH se estableció en $6 \pm 1\%$ (n = 12).

3.3.5 Medida de la viabilidad celular mediante tinción con yoduro de propidio

En algunos experimentos, la viabilidad celular se determinó mediante la tinción con yoduro de propidio (PI). Este compuesto, es un agente intercalante

fluorescente utilizado para teñir el ADN. Dada su alta polaridad, es impermeable en células que presentan intacta la membrana plasmática, lo que permite visualizar a células cuya membrana esté rota, un proceso que es característico de la necrosis y apoptosis tardía.

Para llevar a cabo la tinción con PI, se añadió PI (10µg/ml; Santa Cruz Biothecnology) en el medio de cultivo durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio de cultivo y se realizaron 5 lavados con PBS. Posteriormente, las células se recogieron en 200µl de FacsFlow y se analizaron gracias un citómetro de flujo FACSCalibur® (Becton Dickinson S.A.) y el programa BD Cellquest™ PRO. La detección del PI se realizó mediante excitación a 488 nm y detección en FL2 (584/42nm). Su posterior análisis se llevó a cabo empleando el software FlowJO (Tree Star inc.).

3.3.6 Grupos experimentales y tratamientos

3.3.6.1 Grupo Experimental I: Pre-tratamiento con TMF previo a la OGD

Los tratamientos y tiempos de obtención de los diferentes tipos de muestras se esquematizan en la **Figura 3.8**.

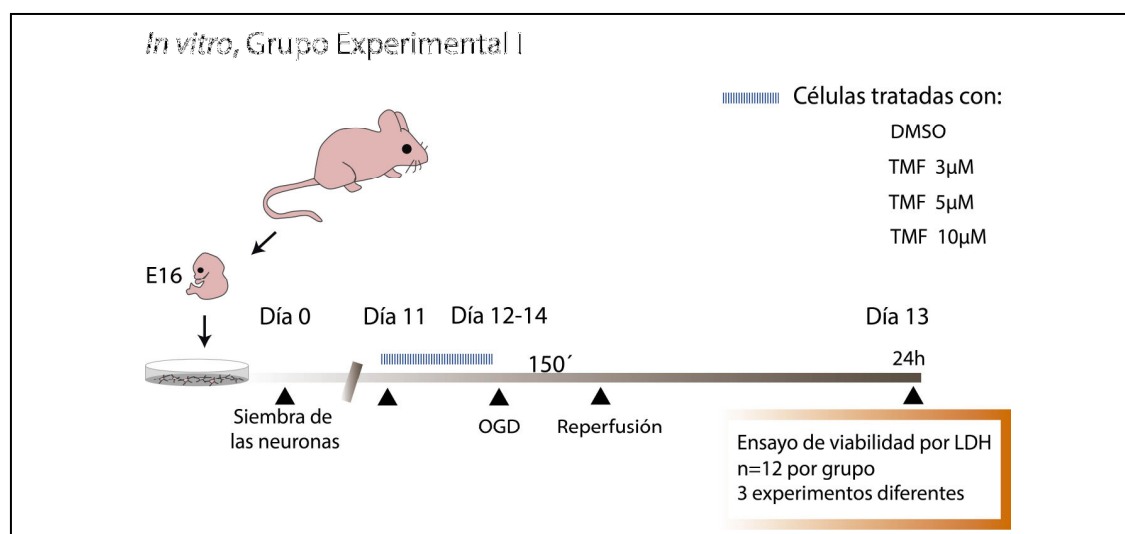


Figura 3.8. Grupo experimental diseñado para evaluar el efecto concentración-respuesta del antagonista de AhR TMF tras OGD en cultivos puros de neuronas. El tratamiento con TMF fue administrado 24h antes de la inducción de la OGD.

- **Neuronas control:** Neuronas control pre-tratadas con vehículo (DMSO), TMF (3 μ M), TMF (5 μ M) y TMF (10 μ M) 24h antes de la inducción de la OGD.
- **Neuronas OGD:** Neuronas sometidas a OGD pre-tratadas con vehículo (DMSO), TMF (3 μ M), TMF (5 μ M) y TMF (10 μ M) 24h antes de la inducción de la OGD.

En todos los grupos descritos, 24h después de la reperfusión, las células y el medio fueron recogidos para el análisis de la viabilidad celular.

3.3.6.2 Grupo experimental II: Tratamiento con TMF durante la OGD y durante la reperfusión

Los tratamientos y tiempos de obtención de los diferentes tipos de muestras se esquematizan en la **Figura 3.9**.

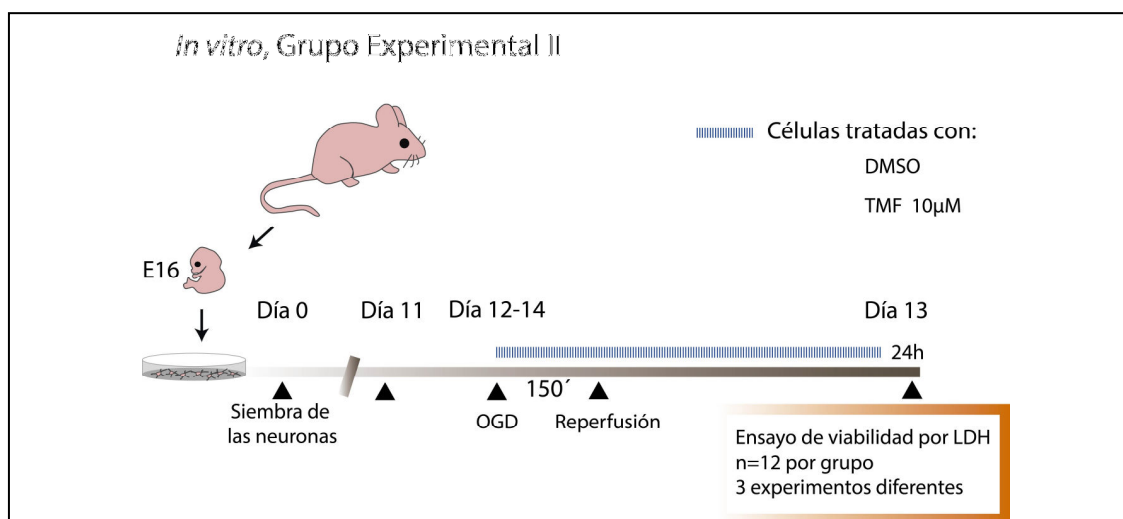


Figura 3.9. Grupo experimental diseñado para evaluar el efecto del antagonista de AhR TMF en dosis única en cultivos puros de neuronas tras ser expuestos a OGD. La administración de TMF se realizó durante los 150 minutos de OGD y durante las 24 horas de reperfusión.

- **Neuronas control:** Neuronas control tratadas con vehículo (DMSO) o TMF (10 μ M) durante los 150 minutos de exposición a la OGD y durante la reperfusión.
- **Neuronas OGD:** Neuronas sometidas a OGD tratadas con vehículo (DMSO) o TMF (10 μ M) durante los 150 minutos de exposición a la OGD y durante la reperfusión.

24h después de la reperfusion, las células y el medio fueron recogidos para el análisis de la viabilidad celular.

3.3.6.3 Grupo Experimental III: Tratamiento con L-kinurenina, en presencia y ausencia del antagonista de AhR TMF

Los tratamientos y tiempos de obtención de los diferentes tipos de muestras se esquematizan en la **Figura 3.10**.

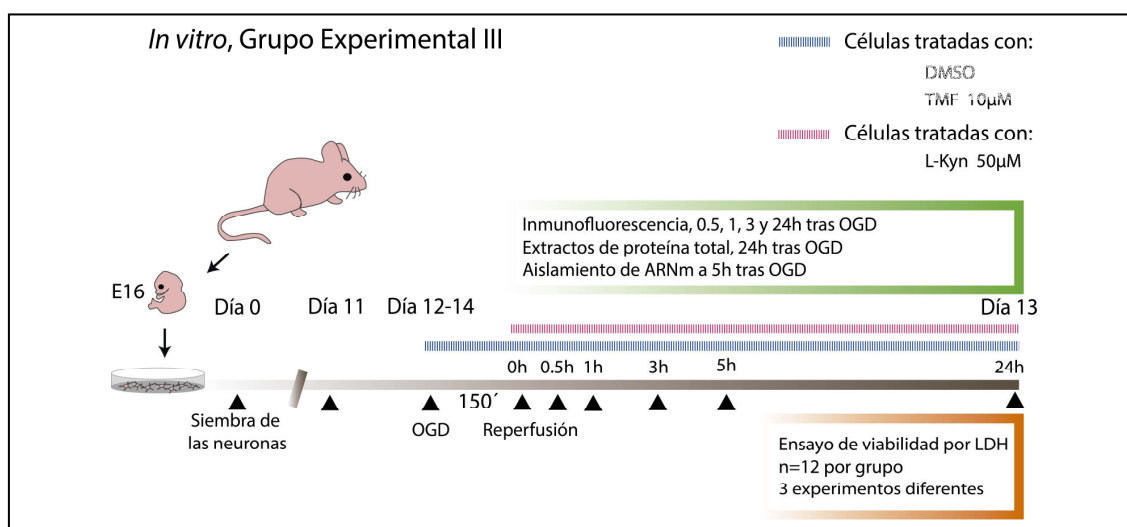


Figura 3.10. Protocolo experimental diseñado para evaluar el efecto del tratamiento único y/o combinado de TMF y L-Kyn en cultivos puros de neuronas tras OGD. La administración de TMF se realizó durante la OGD y durante las 24h de reperusión. El tratamiento con L-Kyn fue realizado durante las 24h de reperusión.

- **Neuronas control:** Neuronas control tratadas con vehículo (DMSO), L-Kyn (50μM), TMF (10μM) y L-Kyn (50μM) + TMF (10μM). El tratamiento con TMF se realizó durante los 150 minutos de exposición a la OGD y durante la reperusión. El tratamiento con L-kinurenina se realizó únicamente durante la reperusión.

- **Neuronas OGD:** Neuronas sometidas a OGD tratadas con vehículo (DMSO), L-Kyn (50μM), TMF (10μM) y L-Kyn (50μM) + TMF (10μM). El tratamiento con TMF se realizó durante los 150 minutos de exposición a la OGD y durante la reperusión. El tratamiento con L-kinurenina se realizó únicamente durante la reperusión.

En todos los grupos, las células fueron procesadas 0,5, 1, 3, 5 y 24h tras la reperusión para diferentes análisis bioquímicos y moleculares. De manera adicional, 24h después de la reperusión, las células y el medio fueron recogidos para el análisis de la viabilidad celular.

3.3.6.4. Grupo Experimental IV: Pre-tratamiento con TMF antes del tratamiento con NMDA

Los tratamientos y tiempos de obtención de los diferentes tipos de muestras se esquematizan en la **Figura 3.11**.

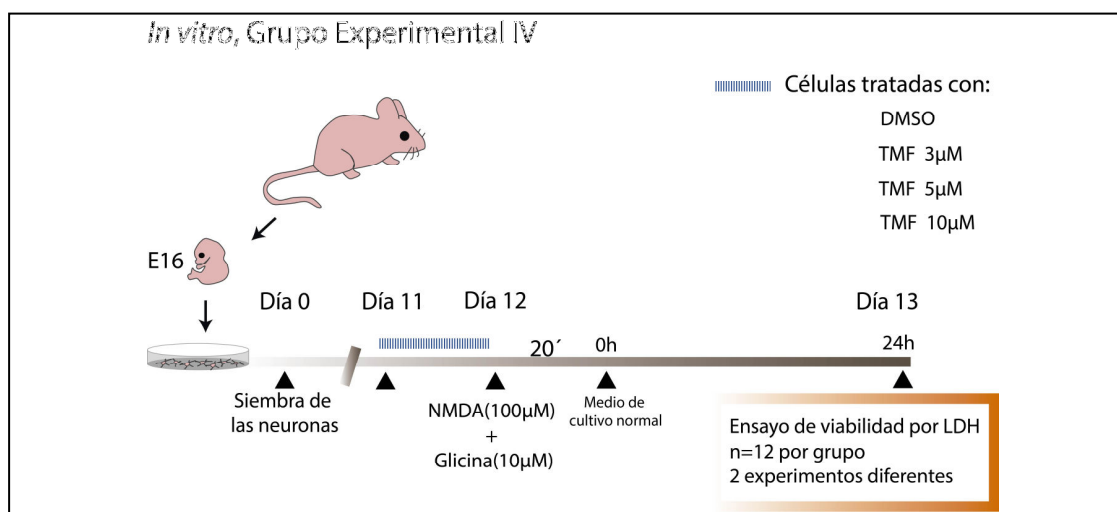


Figura 3.11. Protocolo experimental diseñado para evaluar el efecto del pre-tratamiento con diferentes concentraciones de TMF en cultivos puros en la excitotoxicidad inducida por NMDA.

- **Neuronas control:** Neuronas control pre-tratadas con vehículo (DMSO), TMF (3µM), TMF (5µM) y TMF (10µM) 24h antes de ser expuestas a NMDA (solución libre de magnesio sin NMDA + glicina).
- **Neuronas NMDA:** Neuronas pre-tratadas con vehículo (DMSO), TMF (3µM), TMF (5µM) y TMF (10µM) 24h antes de ser expuestas a NMDA (solución libre de magnesio con NMDA + glicina).

24h después del insulto citotóxico, las células y el medio fueron recogidos para el análisis de la viabilidad celular.

3.3.6.5 Grupo Experimental V: Pre-tratamiento con TMF, L-kinurenina y TMF + L-kinurenina antes del tratamiento con NMDA

Los tratamientos y tiempos de obtención de los diferentes tipos de muestras se esquematizan en la **Figura 3.12**.

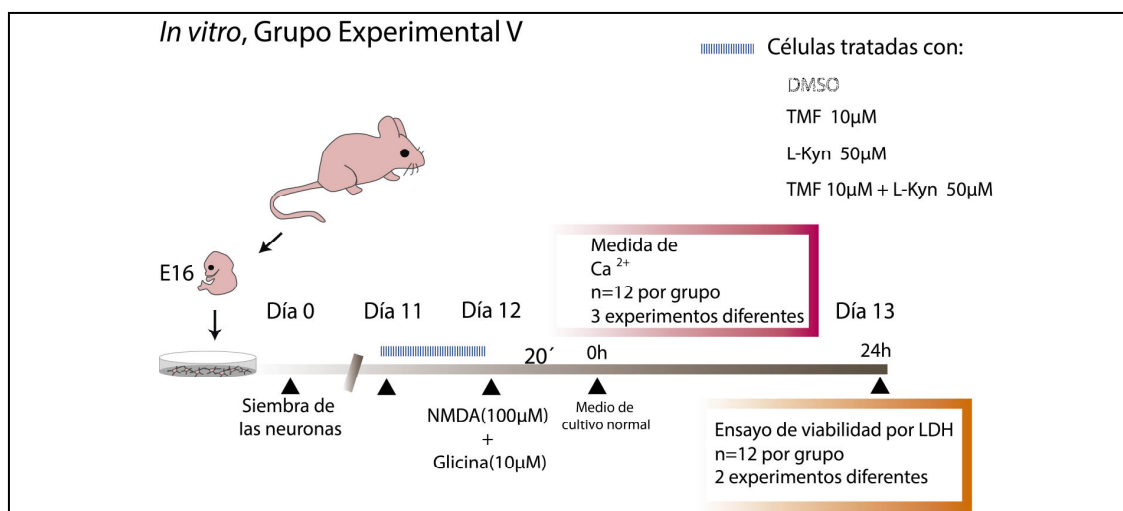


Figura 3.12. Protocolo experimental diseñado para evaluar el efecto del pre-tratamiento de TMF y/o L-Kyn en la excitotoxicidad mediada por NMDA + glicina en cultivos puros de neuronas de rata, y en la respuesta del calcio intracelular tras el tratamiento con NMDA.

- **Neuronas control:** Neuronas pre-tratadas con vehículo (DMSO), L-Kyn (50µM), TMF (10µM) y L-Kyn (50µM) + TMF (10µM) 24h antes de ser expuestas a NMDA (solución libre de magnesio sin NMDA + glicina).
- **Neuronas NMDA:** Neuronas pre-tratadas con vehículo (DMSO), L-Kyn (50µM), TMF (10µM) y L-Kyn (50µM) + TMF (10µM) 24h antes de ser expuestas a NMDA (solución libre de magnesio con NMDA + glicina).

24h después del insulto citotóxico, las células y el medio se recogieron para el análisis de la viabilidad celular. De manera adicional se llevó a cabo la medida del Ca^{2+} intracelular tras el tratamiento con NMDA.

3.4. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

En el caso de los estudios *in vivo*, el material de partida para la extracción de ARN, homogenados totales de corteza, aislamiento de núcleos/citoplasmas,

aislamiento de membranas, homogenados para experimentos de co-inmunoprecipitación y homogenado para la determinación de los metabolitos de la ruta de las kinureninas, se obtuvo a partir de la disección de la corteza cerebral infartada.

De manera adicional, en algunos experimentos se realizó la disección de la zona infartada o “core” y de la zona de peri-infarto para ser procesados de manera independiente. Para este procedimiento, el animal se sacrificó por dislocación cervical, el cerebro se extrajo rápidamente y se colocó en una matriz cerebral (Brain Matrix, WPI, UK) donde se realizaron cortes coronales de 1mm. En los estudios *in vitro*, el aislamiento de las células se realizó según lo especificado y teniendo en cuenta el tipo de ensayo.

3.4.1 Extracción de ARN mensajero

Para llevar a cabo la extracción del ARNm de la corteza cerebral infartada, se utilizó el protocolo en un paso, basado en la separación de componentes celulares por su solubilidad en soluciones acuosas u orgánicas (Chomczynski y Sacchi, 1987). En primer lugar, el tejido se homogeneizó mecánicamente utilizando Trizol® (Invitrogen). Una vez homogeneizado, se añadió cloroformo a partes iguales y, tras mezclar por agitación, se centrifugaron las muestras obteniéndose dos fases: una acuosa, donde está el ARN, y otra orgánica, donde están la mayoría de los componentes celulares. Se descartó la fase orgánica y el ARN se precipitó con isopropanol (Invitrogen) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez precipitado, se lavó con etanol al 75% y se resuspendió en agua libre de RNasa (Invitrogen).

En los estudios *in vitro*, el ARNm de los cultivos puros de neuronas se extrajo empleando el *RNeasy Mini kit* (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En ambos casos, la cantidad de ARN se determinó espectrofotométricamente (Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer) y su pureza se expresó como el cociente entre los valores de absorbancia a 260nm y 280nm (1,8-2,0). Las muestras de ARN fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización.

3.4.2 Homogenado de proteínas

Para obtener una muestra del homogenado total de corteza cerebral o de peri-infarto y *core* de manera independiente, se homogeneizó un trozo de tejido mediante ultrasonidos en un volumen de 300 µl de una solución de homogeneización a 4°C. La solución de homogeneización es una solución tamponada de la siguiente composición: sacarosa (320 mM), DL-ditiotreitol (1mM; Invitrogen), los inhibidores de proteasas leupeptina (10 µg/ml; Roche), tripsina de soja (10 µg/ml; Roche) y la aprotinina (2 µg/ml; Roche), Nonidet P40 (0,2%; Roche), así como el cóctel para la inhibición de fosfatasa, PhosphoStop (utilizado según indicaciones del fabricante; Roche), y Tris (50 mM, pH 7,0).

Para la preparación de extractos totales de proteína a partir de los cultivos puros de neuronas, las células se lavaron 2 veces en PBS frío y posteriormente se recogieron de la placa en la solución de homogeneización previamente descrita. En este caso, la homogeneización se realizó haciendo pasar a las células a través de una jeringa de 21G 5 veces.

Tanto para la preparación de los extractos de neuronas corticales de rata y de los extractos de tejidos corticales que se utilizaron en los experimentos de co-inmunoprecipitación, la homogeneización y la lisis se realizó mediante homogeneizador Dounce utilizando vidrio-teflón, en un tampón de lisis que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 1mM, NP-40 1%, SDS 0,1%, deoxicolato de sodio 0,1% así como los inhibidores de proteasas leupeptina (10 µg/ml; Roche), tripsina de soja (10 µg/ml; Roche) y la aprotinina

(2 µg/ml; Roche), Nonidet P40 (0,2%; Roche) y el cóctel para la inhibición de fosfatasas, PhosphoStop (utilizado según indicaciones del fabricante; Roche).

En todos los casos, una vez homogeneizada la muestra de partida, los extractos se centrifugaron a 13000 x g durante 15 minutos a 4°C, recogiendo el sobrenadante que se considera el lisado total en condiciones nativas. Para evaluar la concentración de proteína del lisado se utilizó el ensayo de Bradford (Bradford, 1976). Una vez finalizado el procesamiento, se congelaron las muestras a -80°C hasta su utilización.

3.4.3 Extracción de núcleos y citosoles

Las muestras destinadas a la obtención de las fracciones citosólica y nuclear se procesaron inmediatamente tras sacrificar a los animales o tras recoger las células de los cultivos. En un primer paso se procedió a la disociación mecánica del tejido en una solución hipotónica (tampón HEPES 10mM a pH 7.9, EDTA 1mM, EGTA 1mM, KCl 10mM, NaF 50µM, NaVO₄ 50mM y Na₂MoO₄ 0,1mM). Tras dejar reposar en frío, se añadió el detergente Nonidet P40 (0,5%; Roche) y se agitó para facilitar la rotura de las membranas plasmáticas. Se centrifugó durante 1 minuto a 4°C y 13000 x g y se recogió el sobrenadante que constituye el extracto citosólico. En un segundo paso, se añadió una solución hipertónica (tampón HEPES 20 mM a pH 8.0, EDTA 1mM, EGTA 1mM, NaCl 10mM, NaF 50µM, NaVO₄ 50µM y Na₂MoO₄ 0,1mM) al precipitado y se agitó suavemente a 4°C durante 30 minutos. Tras este tiempo, la muestra se centrifugó 5 minutos a 13000 x g en frío, se recogió el sobrenadante correspondiente al extracto nuclear y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

3.4.4 Preparación de extractos enriquecidos en membranas

La preparación de fracciones de proteínas de membranas de tejido cortical procedente de animales sham y pMCAO se realizó utilizando el kit Mem-PER

Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit (Pierce) según lo descrito previamente (Zhou et al., 2010). Este kit consiste en 3 reactivos. El reactivo A es un tampón de lisis, el reactivo B es un tampón de dilución del detergente, y el reactivo C es un tampón de solubilización de membranas. Todos los reactivos del kit se suplementaron con inhibidores de fosfatasas y proteasas. Previa homogeneización del tejido cortical en tampón TBS mediante un homogeneizador Dounce vidrio-teflón (10 *golpes*) el extracto se centrifugó a $1000 \times g$ durante 5 minutos a 4°C . El precipitado resultante se resuspendió en $150 \mu\text{l}$ del reactivo A, y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, con vórtex ocasionales. Posteriormente, las muestras se mantuvieron en frío y las proteínas de membrana se solubilizaron mediante la incubación durante 30 minutos con $450 \mu\text{l}$ del reactivo C diluido 2:1 en reactivo B. El extracto de proteínas solubilizadas se centrifugó a $10000 \times g$ durante 3 minutos para eliminar el debris celular y el sobrenadante resultante se incubó durante 20 minutos a 37°C seguido de una centrifugación a $10000 \times g$ durante 2 minutos. Mediante este procedimiento se consiguió la separación de las fracciones hidrofílicas e hidrofóbicas (proteínas de membrana), que se sitúan en la parte superior e inferior del tubo respectivamente, separadas por una pequeña interfase. La fracción hidrofóbica se normalizó al volumen de la fracción hidrofílica usando el reactivo B diluido 1:4 en agua. Las fracciones resultantes fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior utilización.

3.4.5 Fraccionamiento subcelular

La obtención de las fracciones totales de membrana (P2), fracción tritón soluble (TSF) y la fracción tritón insoluble (TIF) en neuronas corticales de rata, se realizó según lo descrito previamente (Ferrario et al., 2011; Gardoni et al., 2009; Gardoni et al., 2001) y siguiendo el esquema de la **Figura 3.13**. Para ello, las neuronas se trataron durante 24h con vehículo, TMF, L-Kyn y L-Kyn + TMF. Transcurrido este tiempo, 20×10^6 células por condición se homogeneizaron

mediante 20 golpes a través de un homogeneizador Dounce vidrio-teflón en 400 μ l de *tampón 1* compuesto por sacarosa 0,32M, Hepes 1mM, $MgCl_2$ 1mM, EDTA 1 mM, $NaHCO_3$ 1mM, así como el cóctel para la inhibición de fosfatasa, PhosphoStop (según indicaciones del fabricante) (Roche), y Tris (10 mM, pH 7,0). El extracto celular se centrifugó a 1000 x g durante 5 minutos obteniéndose la fracción P1 enriquecida en membranas nucleares. El sobrenadante resultante (S1) se centrifugó a 13000 x g durante 15 minutos para obtener la fracción cruda de membranas (P2). Esta fracción se resuspendió en 1000 μ l de *tampón 2* compuesto por KCl 75 mM y Tritón X-100 al 1% y se centrifugó a 100000 x g durante 1 h en ultracentrífuga (Sorvall Ultra Pro 80).

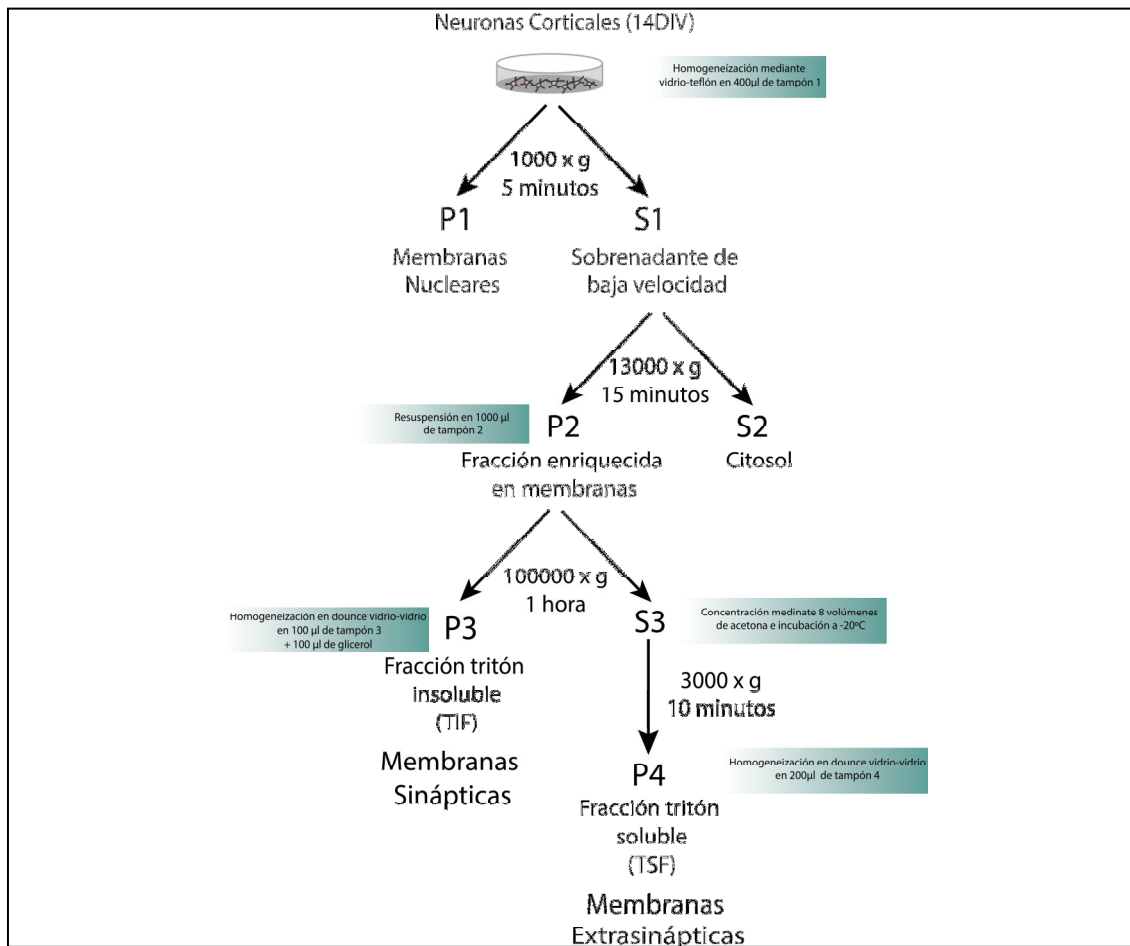


Figura 3.13. Protocolo de fraccionamiento subcelular utilizado para la obtención de la fracción cruda de membrana (P2), la fracción tritón soluble (TSF, P4) y la fracción tritón insoluble (TIF, P3) en neuronas corticales de rata.

El precipitado resultante de la centrifugación (P3) se homogeneizó en un homogeneizador Dounce vidrio-vidrio mediante 20 golpes en 100 μ l de *tampón 3* compuesto por 20 mM de HEPES, pH 7,4. Una vez homogeneizado, se le añadieron 100 μ l de glicerol, obteniéndose por tanto la fracción tritón insoluble (TIF). El sobrenadante resultante de la centrifugación (S3) se concentró añadiendo 8 volúmenes de acetona fría sobre la muestra y posterior incubación durante 24 horas a -20°C. Finalmente, la muestra se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos y el precipitado (P4) se solubilizó mediante sonicación en un volumen de 200 μ l de *tampón 4* que contenía sacarosa 0,32M, HEPES 1mM, MgCl₂ 1mM, EDTA 1 mM, NaHCO₃ 1mM, Tris (10 mM, pH 7,0), Tritón X-100 al 1% y SDS 1%. El extracto resultante se corresponde con la fracción tritón soluble (TSF). Todas las muestras resultantes se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

3.4.6 Preparación del tejido y cultivos celulares para estudios de inmunofluorescencia

Los animales se sacrificaron mediante una dosis letal de pentobarbital sódico y se perfundieron con una solución de lavado a través del ventrículo izquierdo (tampón fosfato 0,1 M, pH 7.4), seguido de una solución fijadora de paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato 0,1 M. Se extrajo el cerebro y se prosiguió su fijación durante 12 horas a 4°C en la misma solución. Posteriormente, el tejido se mantuvo durante 72 horas en una solución de sacarosa al 30% en tampón fosfato 0,1 M a 4°C para proteger su integridad al congelarlo. Finalmente, se congeló mediante un proceso de congelación rápido “snap frozen” en isopentano (Sigma Aldrich) a -35/-40 °C, y los cerebros se almacenaron a -80°C hasta el momento de su procesamiento. Para llevar a cabo la histología por inmunofluorescencia, se cortaron secciones coronales de cerebro de 30 μ m de grosor con la ayuda de un micrótomos de congelación (Leica).

Para la inmunofluorescencia en cultivos neuronales, las neuronas se sembraron en placas de 6 pocillos, sobre cubreobjetos de vidrio tratados previamente con poli-D-lisina. A los distintos tiempos seleccionados, las células se lavaron con PBS, y se procedió a su fijación mediante la incubación con PFA al 2% durante 20 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con PBS, y se almacenaron a 4°C en PBS hasta su posterior utilización.

3.4.7 Preparación de las muestras para la determinación de triptófano y el metabolito L-kinurenina

La detección de triptófano y del metabolito L-kinurenina se realizó gracias a una colaboración con el profesor Andrew Harkin del Trinity College, Dublín. Para ello, se llevó a cabo la disección de la zona infartada tras pMCAO, y se juntaron muestras de 2 animales por cada tiempo (que incluían la zona infartada así como la zona peri-infarto), pesando la cantidad exacta de tejido obtenida en cada caso. La sonicación de las muestras se realizó según lo descrito previamente (Gibney et al., 2012). Así, el tejido fue homogeneizado en 1 ml de una solución que contenía ácido acético glacial (50nM), acetato de zinc (100 mM), acetonitrilo al 3%, ácido perclórico al 7%, todo ello disuelto en agua HPLC grade. Los homogenados de cerebro se centrifugaron a 20000 x g durante 20 minutos y los sobrenadantes se pasaron a nuevos eppendorfs utilizando una jeringa acoplada a un filtro de 0.45 µm (Phenomenex). Las muestras de plasma sanguíneo obtenidas de los mismos animales fueron procesadas de manera similar a lo descrito para el tejido cerebral. Las muestras fueron almacenadas a -80° hasta su posterior utilización para la medida por HPLC.

3.4.8 Preparación de las muestras para la determinación de BDNF

Para la determinación de la concentración total de BDNF, se llevó a cabo la disección de la zona infartada y zona de peri-infarto tras pMCAO, y se procedió a la homogeneización del tejido y sonicación según lo descrito previamente en

el apartado correspondiente. Con el fin de incrementar la cantidad de BDNF detectable en el tejido cerebral, se realizó un proceso de acidificación de la muestra y posterior neutralización según lo descrito en la literatura (Okragly y Haak-Frendscho, 1997). Para ello, se añadió 1 µl de HCl 1N por cada 50µl de extracto tisular, obteniendo un pH final inferior a 3. La muestra acidificada se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se neutralizó mediante NaOH 1N, añadiendo la cantidad necesaria para obtener un pH final de 7.6. En este punto, las muestras se congelaron a -80°C hasta su posterior utilización.

3.4.9 Obtención de sangre por punción cardiaca para análisis de plasma sanguíneo

La extracción de sangre se llevó a cabo mediante punción cardiaca en el ventrículo derecho. La extracción se realizó con una jeringa de 25G pre-tratada con una solución de citrato de sodio al 3,8%. Para la obtención de plasma sanguíneo, se tomaron 100µl de sangre que se transfirieron a un eppendorf con citrato de sodio (10 % volumen final), y se centrifugó durante 10 minutos a 3500 rpm a 4°C. Una vez terminada la centrifugación, la fase superior carente de elementos formes se transfirió a un nuevo eppendorf y se almacenó a -80°C para su posterior utilización.

3.5 TÉCNICAS EXPERIMENTALES

3.5.1 RT-PCR (*Real Time – Polymerase Chain Reaction*)

A partir de las muestras de ARNm se llevó a cabo la síntesis del ADN complementario (ADNc) por transcripción reversa de 500-1000 ng de ARNm, empleando la enzima Superscript II Reverse transcriptase (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADNc fue cuantificado espectrofotométricamente (Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer) y su pureza

se expresó como el cociente entre los valores de absorbancia a 260nm y 280nm (1,8-2,0). Las muestras de ADNc fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización. El estudio de la expresión de ARNm se realizó por triplicado en un termociclador Bio-Rad iQ5. Para los experimentos *in vivo*, dicha expresión se normalizó de acuerdo a la expresión génica de la actina y, en el caso de los experimentos *in vitro*, la normalización se realizó con respecto a GADPH. Todos los genes se sometieron a una desnaturalización a 95°C por 5 min seguida de 45 ciclos de 95°C 10 s, 60°C 30 s, y 72°C 40 s. Se incluyó un análisis de la curva de fusión (curva de *melt*) con el fin de confirmar la formación de un único producto de PCR. Los primers específicos (**Tabla 3.2**) fueron obtenidos vía PUBMED, y la especificidad de los mismos fue confirmada utilizando la herramienta BLAST search (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

3.5.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida y western blot

Para determinar los niveles de expresión de AhR y ARNT, así como los niveles de expresión de las distintas subunidades de los receptores NMDA y las proteínas PSD95 y Sap102 en la zona de peri-infarto y *core* tras pMCAO, se utilizaron 40 µg de proteína de cada una de las regiones. Para la determinación del resto de marcadores (Ver **Tabla 3.3**), se utilizaron 30 µg de proteína de extractos preparados a partir de *core* + peri-infarto. En el caso del análisis de las fracciones citosólicas y nucleares generadas a partir de tejido cortical, se utilizaron 50 µg de proteína de cada una de las fracciones. Para las determinaciones proteicas a partir de homogenados procedentes de los cultivos neuronales, se utilizaron en todos los casos 50 µg de proteína. Para el análisis de las fracciones de membrana *in vivo* e *in vitro*, se utilizaron 50 µg de proteína. En todos los casos, las muestras previamente diluidas en el tampón de carga (Laemli + beta-mercaptoetanol) fueron desnaturalizadas a 95°C durante 5 minutos y separadas mediante electroforesis en un gel al 7-14% P/V de poliacrilamida-SDS a 150mV.

AhR (<i>Mus musculus</i>)	F: 5'-GGTGCCTGCTGGATAATTCATCTG-3' R: 5'-TCGTCCTTCTTCATCCGTCAGTG-3'
Cyp1a1 (<i>Mus musculus</i>)	F: 5'-GGTTAACCATGACCGGGAAC-3' R: 5'-TGCCCAAACCAAAGAGAGTGA-3'
AhRR (<i>Mus musculus</i>)	F: 5'-GGCTTACCATGGGCGCTGAG-3' R: 5'-CCACCAGAGCGAAGCCATTGAG-3'
Cyp1b1 (<i>Mus musculus</i>)	F: 5'-GCTCTGTACGCCAACAACG-3' R: 5'-GCTCTGTACGCCAACAACG-3'
NR1 (<i>Mus musculus</i>)	F: 5'-CTCTAGCCAGGTCTACGCTATCC-3' R: 5'-GACGGGGATCTGTAGAAGCCA-3'
NR2A (<i>Mus musculus</i>)	F: 5'-CAACGAAGGGATGAATGTGA-3' R: 5'-ACAAAGGGCACGGAGAAGT-3'
NR2B (<i>Mus musculus</i>)	F: 5'-TGCTACAACACCCACGAGAA-3' R: 5'-CTCCTCCAAGGTAACGATGC-3'
TDO (<i>Mus musculus</i>)	F: 5'-AGGAACATGCTCAAGGTGATAGC-3' R: 5'-CTGTAGACTCTGGAAGCCTGAT-3'
IDO2 (<i>Mus musculus</i>)	F: 5'-ATGGAGCCTCAAAGTCAGAGC-3' F: 5'-CGCTGCTCACGGTAACCTCTTA-3'
IDO1 (<i>Mus musculus</i>)	F: 5'-TGGCACTCAGTAAAATATCTCCT R: 3'-CAGGCAGATTCTAGCCACA
Actina (<i>Mus musculus</i>)	F: 5'-TGTGATGGTGGGAATGGGTCAGAA-3' R: 5'-TGTGGTGCCAGATCTTCTCCATGT-3'
Cyp1a1 (<i>Rattus norvegicus</i>)	F: 5'-CCAAACGAGTTCCGGCCT-3' R: 5'-TGCCCAAACCAAAGAGAATGA-3'
Cyp1b1 (<i>Rattus norvegicus</i>)	F: 5'-AACCCTTGATGACCGCAGTAAA-3' R: 5'-TGTGGTACTCCAATAGGGACAAGATC-3'
NR1 (<i>Rattus norvegicus</i>)	F: 5'-GAGGACCTACGTCTCTTGAAGCTGGAG-3' R: 5'-TCACAGAAGTGCGATCTGGTGACCACG-3'
NR2A (<i>Rattus norvegicus</i>)	F: 5'-GGAGGAGCTGGAGACACTGTGGCTTAC-3' R: 5'-TTAGGTGAGTCCATTCTTGAGGAGTTC-3'
NR2B (<i>Rattus norvegicus</i>)	F: 5'-GCTGTGCTCAACTACATGGCTGGAAGG-3' R: 5'-GACCATGCCAGGCTTGCCAGAACAGAC-3'
TDO (<i>Rattus norvegicus</i>)	F: 5'-GGCTATTATTATCTGCGCTCAACTG-3' R: 5'-GAACCAGGTACGATGAGAGGTTAAA-3'
BDNF (<i>Rattus norvegicus</i>)	F: 5'-AGCTGAGCGTGTGTGACAGT-3' R: 5'-ACCCATGGGATTACACTTGG-3'
NPAS4 (<i>Rattus norvegicus</i>)	F: 5'-CCGCTCG-AGATGGACCGATCCACCAAGGGC-3' R: 5'-GGAATTGCGAAACGTTG-GTTCCTCCAC-3'
ATF3 (<i>Rattus norvegicus</i>)	F: 5'-ATGATGCTTCAACACCCAGGC-3' R: 5'-TTAGCTCTGCAATGTTCCCTC-3'
GADPH (<i>Rattus norvegicus</i>)	F: 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTG-3' R: 5'-GGGCCATCCACAGTCTTCTG-3'

Tabla 3.2 Secuencias de primers utilizadas para la determinación de los niveles de ARNm por RT-PCR.

Posteriormente, se realizó la transferencia de la proteína de cada muestra a membranas de PVDF (Amersham Biosciences) o nitrocelulosa (Amersham Biosciences). Las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5% en TBS-T (0,05% Tween 20 en TBS) y se incubaron con sus anticuerpos primarios

correspondientes (Tabla 3.3) a 4°C durante 24 horas. Posteriormente, las membranas se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano conjugada a IgG (Santa Cruz Biotechnology) con posterior exposición a reactivos de detección quimioluminiscentes (PerkinElmer Life and Analytical Sciences). Las bandas inmunorreactivas se visualizaron utilizando el software GeneSnap Image Acquisition (SynGene; Version 7.08). Las bandas específicas se cuantificaron usando el software GeneTools Gel Analysis (SynGene versión 4.01)

Anticuerpo	Origen	Dilución	Casa Comercial
Anti AhR	Conejo	<i>In vivo</i> : 1:1000 <i>In vitro</i> : 1: 500	Enzo Life Sciences
Anti AhR	Conejo	<i>In vivo</i> : 1:1000 <i>In vitro</i> : 1: 500	Thermo Scientific
Anti ARNT	Conejo	<i>In vivo</i> : 1:500 <i>In vitro</i> : 1:250	Enzo Life Sciences
Anti NR1	Conejo	<i>In vivo</i> : 1:1000 <i>In vitro</i> : 1: 500	Cell Signalling
Anti NR2A	Conejo	<i>In vivo</i> : 1:1000 <i>In vitro</i> : 1: 500	Cell Signalling
Anti NR2B	Conejo	<i>In vivo</i> : 1:1000 <i>In vitro</i> : 1: 500	Cell Signalling
Anti NR2B	Ratón	<i>In vivo</i> : 1:1000 <i>In vitro</i> : 1: 500	Cell Signalling
Anti CREB	Ratón	<i>In vivo</i> : 1:1000 <i>In vitro</i> : 1: 500	Sigma Aldrich
Anti p-CREB	Conejo	<i>In vivo</i> : 1:1000 <i>In vitro</i> : 1: 500	Cell Signalling
Anti CBP	Conejo	<i>In vivo</i> : 1:500 <i>In vitro</i> : 1: 250	Santa Cruz
Anti Sap102	Ratón	<i>In vivo</i> : 1:1000 <i>In vitro</i> : 1: 500	Cell Signalling
Anti PSD95	Ratón	<i>In vivo</i> : 1:1000 <i>In vitro</i> : 1: 500	Cell Signalling
Anti p53	Conejo	<i>In vivo</i> : 1:500	Cell Signalling
Anti Puma	Ratón	<i>In vivo</i> : 1:1000	Cell Signalling
Anti bcl-x	Ratón	<i>In vivo</i> : 1:1000	Cell Signalling

Tabla 3.3. Anticuerpos empleados para la inmunodetección de proteínas por la técnica de western blot.

Los niveles de actina se emplearon como control de carga. Los niveles de Sp1 se utilizaron para la pureza de las fracciones núcleo y citoplasma.

3.5.3 Co-inmunoprecipitación

Los experimentos de co-inmunoprecipitación (co-ip) se realizaron utilizando el kit comercial Protein G Immunoprecipitation Kit (Sigma) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Para ello, 1500 µg de proteína de los extractos procedentes de neuronas y tejido cortical se completaron hasta un volumen de 600 µl con un tampón de co-ip proporcionado en el kit, se traspasaron a una columna de co-ip y se pre-incubaron durante 1 hora en la noche a 4°C con 50 µl de la proteína G agarosa. Posteriormente, se centrifugaron a 12000 x g para eliminar las proteínas que se unen de manera inespecífica a la agarosa y obtener así un sobrenadante limpio para los experimentos de co-ip. El sobrenadante limpio se incubó con 5µg de los anticuerpos de interés (anti-Sap102 rabbit, anti-AhR rabbit, anti-NR2B mouse, anti-PSD95 rabbit y anti-CBP rabbit) durante 16 horas a 4°C en rotación. Transcurrido este tiempo, a cada muestra se le añadió 50 µl de proteína G agarosa y se incubó durante 5 horas más a 4°C en rotación. Los complejos inmunes se aislaron mediante centrifugación a 12000 x g a 4°C, 3 lavados en tampón de co-ip 1X y un último lavado en tampón de co-ip 0,1X. Finalmente, las proteínas se eluyeron de la columna y se separaron de la proteína G agarosa mediante la desnaturalización a 100°C en tampón laemmli 1X. Las proteínas resultantes se analizaron mediante la técnica de western blot utilizando los anticuerpos descritos en la **Tabla 3.3**.

3.5.4 Inmunofluorescencia

La detección de proteínas por inmunofluorescencia se realizó a partir de secciones de cerebro de 30µm obtenidas mediante microtomo. Tras realizar

varios lavados en KPBS, se procedió a la permeabilización del tejido, así como al bloqueo de uniones inespecíficas, mediante la incubación de las secciones en KPBS con 0,25% de Tritón X-100 y 5% de suero (Jackson Immuno Research), durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación.

En los casos en los que los anticuerpos primarios estaban hechos en ratón, se utilizó el kit M.O.M (Vector Labs), según indicaciones del fabricante, para bloquear el marcaje inespecífico. Seguidamente, se procedió a la incubación del anticuerpo primario en la misma solución de bloqueo (incubación en agitación, por toda la noche, 4°C). Tras 3 lavados con T-KPBS, las secciones se incubaron con su correspondiente anticuerpo secundario acoplado a fluorescencia (agitación, 2h, temperatura ambiente) o, en el caso de requerir una amplificación de la señal, se utilizó el sistema biotina-avidina.

En aquellos casos en los que las combinaciones de anticuerpos presentaban la misma especificidad, se procedió a una inmunofluorescencia seriada, con una fijación de formalina al 10% entre ambas inmunofluorescencias. En algunos casos, previo al montaje, se procedió a la tinción de núcleos empleando TOPRO (Invitrogen).

Para la inmunofluorescencia en los cultivos neuronales, se procedió a la permeabilización (PBS-Triton 0,2%) y al bloqueo de las uniones inespecíficas con PBS-BSA (albúmina de suero bovino) al 5%, y a la incubación con los anticuerpos primarios durante 16 horas a 4°. Finalmente, tras varios lavados, las células se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios y, a continuación se procedió a colocar los cubreobjetos de vidrio en portaobjetos embebidos con medio de montaje acuoso para inmunofluorescencia. En la **Tabla 3.4** se resumen las combinaciones de anticuerpos empleadas para los estudios de colocalización en los experimentos *in vivo* e *in vitro*.

Inmunofluorescencia en ratón:				
Colocalización	Anticuerpo Primario	Anticuerpo Secundario	Anticuerpo Terciario	Sueros Bloqueo
AhR	Anti AhR de conejo (Enzo life Sciences) 1:250	Anti conejo biotinilado (cabra) (Vector Lab.) 1:250	Alexa 488 Estreptoavidina (Invitrogen) 1:500	Suero de cabra
En combinación con:				
NeuN(*)	Anti NeuN de ratón (Chemicon) 1:500	Anti ratón Cy3 (burro) (Vector Lab.) 1:500	----	Suero de burro
GFAP(*)	Anti GFAP de ratón (BD Bioscience) 1:500	Anti ratón Cy3 (burro) (Vector Lab.) 1:500	----	Suero de burro
NIMP-R14	Anti NIMP-R14 de rata (ABCAM) 1:250	Anti rata Cy3 (burro) (Vector Lab.) 1:500	----	Suero de burro
Iba-1 (#)	Anti Iba-1 de conejo (Wako) 1:500	Anti conejo Alexa 647(cabra) (Invitrogen) 1:500	----	Suero de cabra
Colocalización	Anticuerpo Primario	Anticuerpo Secundario	Anticuerpo Terciario	Sueros Bloqueo
ARNT	Anti ARNT de conejo (Enzo life Sciences) 1:100	Anti conejo biotinilado (cabra) (Vector Lab.) 1:250	Alexa 488 Estreptoavidina (Invitrogen) 1:500	Suero de cabra
En combinación con:				
NeuN(*)	Anti NeuN de ratón (Chemicon) 1:500	Anti ratón Cy3 (burro) (Vector Lab.) 1:500	----	Suero de burro
Inmunofluorescencia en cultivos puros de neuronas:				
Colocalización	Anticuerpo primario	Anticuerpo Secundario	Anticuerpo Terciario	Sol. Bloqueo
AhR	Anti AhR de conejo (Enzo life Sciences) 1:100	Anti conejo biotinilado (cabra) (Vector Lab.) 1:250	Alexa 488 estreptoavidina (Invitrogen) 1:500	Albúmina de suero bovino
En combinación con:				
NeuN(*)	Anti NeuN de ratón (Chemicon) 1:250	Anti ratón Cy3 (burro) (Vector Lab.) 1:500	----	Albúmina de suero bovino
Colocalización	Anticuerpo primario	Anticuerpo Secundario	Anticuerpo Terciario	Sol. Bloqueo
ARNT	Anti ARNT de conejo (Enzo life Sciences) 1:100	Anti conejo biotinilado (cabra) (Vector Lab.) 1:250	Alexa 488 Estreptoavidina (Invitrogen) 1:500	Albúmina de suero bovino
En combinación con:				
NeuN(*)	Anti NeuN de ratón (Chemicon) 1:250	Anti ratón Cy3 (burro) (Vector Lab.) 1:500	----	Albúmina de suero bovino

Tabla 3.4. Anticuerpos utilizados para la determinación de proteínas en el tejido mediante inmunofluorescencia.

La visualización y la toma de microfotografías de las muestras para inmunofluorescencia se llevó a cabo empleando el microscopio confocal Zeiss y el software ZEN 2009 (Carl Zeiss Microimaging GmbH). Para validar la colocalización de las combinaciones de anticuerpos se utilizaron proyecciones ortogonales de las imágenes. El procesamiento de las imágenes se llevó a cabo con los programas Adobe Photoshop CS6 e ImageJ.

La densitometría de la señal positiva de AhR en núcleo de las neuronas se llevó a cabo según lo descrito (Hurtado et al., 2012) mediante el programa ImageJ. Para ello, se tomo como ROI (*Región of Interest*) el núcleo neuronal, en base a su tinción positiva para TOPRO, y se cuantificó la *Mean Intensity* (intensidad media) y la *Integrated Density* (intensidad media * área teñida) en cada núcleo. Este proceso fue realizado en al menos 200 núcleos de 3 experimentos distintos.

3.5.5 Detección de triptófano y kinureninas en cerebro y plasma por HPLC

Para el estudio de los niveles de triptófano y metabolitos derivados de la vía de las kinureninas, se utilizaron 20 μ l de las muestras previamente homogenadas en fase móvil y filtradas. Este volumen se inyectó en una columna de fase inversa (Kinetex™ Core Shell Technology, área de 100 \times 4.6 mm y tamaño de partícula de 2.6 μ m, Phenomenex) para llevar a cabo la separación de los metabolitos. Los detectores utilizados fueron un detector de tipo PDA-UV detector (Shimadzu SPD-M10A VP) calibrado hasta integrar de 230 y 250 nm, así como un detector de fluorescencia (Shimadzu RF-20A XS Prominence Fluorescence Detector) de excitación en 254 nm y de emisión a 404 nm. Los cromatogramas se analizaron mediante el programa CLASS-VP (Shimadzu). Los resultados se expresan como ng por g de tejido fresco, y en el caso del plasma, como ng por ml de plasma.

3.5.6 Determinación de Ca^{2+} intracelular

Para llevar a cabo la medida del Ca^{2+} intracelular en respuesta a los distintos tratamientos, se utilizaron cultivos puros de neuronas corticales de 14 DIV. 24 horas antes de realizar la medida, las neuronas fueron tratadas con vehículo (DMSO), TMF (10 μM), L-Kyn (50 μM) o TMF (10 μM) + L-Kyn (50 μM). Tras realizar un lavado con PBS, se procedió a la carga de las neuronas durante 45 minutos a 37°C con 10 μM Fluo-4 acetoximetiléster (Fluo-4AM) (Invitrogen) en tampón libre de Mg^{2+} , de composición: NaCl (157mM), KCl (5mM), KH_2PO_4 (0,64mM), NaHCO_3 (3mM), glucosa (5mM), HEPES (20mM), Na_2HPO_4 (0,33mM), CaCl_2 (2mM) y Pluronic-F27, que permite la mayor solubilización del Fluo-4AM. El Fluo-4 es una sonda fluorescente que presenta un incremento de la fluorescencia al unirse al calcio. Ya que este compuesto por sí mismo, al igual que el resto de sondas indicadoras de calcio, es impermeable a la membrana celular, se utiliza un derivado con acetoximetiléster (AM), que lo convierte en permeable, de tal forma, que el Fluo-4AM, difunde de manera pasiva a través de las membranas, y una vez en el interior de la célula, las esterasas producen la rotura del AM, formándose un compuesto impermeable que queda atrapado en el interior celular (Takahashi et al., 1999). Tras la incubación con la sonda, las neuronas se lavaron 2 veces con la solución libre de magnesio, y se incubaron durante 15 minutos con esta misma solución. Los incrementos en el Ca^{2+} intracelular se detectaron mediante el lector de placas FLUOstar OMEGA Fluorescence (BMG LabTechnologies) que se encuentra equipado con 2 inyectores. La fluorescencia de excitación utilizada fue de 485 nm y la de emisión a 520 nm. Todos los experimentos se realizaron a una temperatura constante de 37°C, y los datos se recogieron en intervalos de 0.5, 1 y 2 segundos. Para llevar a cabo la determinación del Ca^{2+} intracelular, se tomaron medidas de la señal basal durante 20 segundos, tras lo cual las neuronas se estimularon con NMDA (100 μM) + glicina (10 μM), registrándose

la emisión de fluorescencia durante 90 segundos. Transcurridos 90 segundos, se trató con KCl (30 mM) y la fluorescencia se registró durante 20 segundos más. En algunos experimentos, el antagonista específico de los receptores NMDA fue incluido para evaluar la especificidad de la respuesta.

3.5.7 Determinación de la concentración de BDNF

La determinación de BDNF se llevó a cabo en el medio de cultivos y extracto celular total de neuronas corticales control o sometidas a OGD. La concentración de BDNF también se determinó en extractos corticales de animales sham y pMCAO 24 horas tras la oclusión. La determinación de BDNF se realizó utilizando el kit BDNF Emax ImmunoAssay System (Promega) según las indicaciones del fabricante. Los niveles de BDNF se calcularon a partir de la curva estándar de cada placa. La curva estándar fue siempre lineal dentro del rango utilizado (0–500 pg/ml) y solo se consideraron como válidas las muestras cuyas medidas se encontraban dentro del rango lineal de la curva estándar. Los niveles de BDNF se determinaron espectrofotométricamente a 480nm mediante el lector de placas TECAN. Los valores finales de BDNF se calcularon como pg/mg de proteína. De cada muestra se tomaron 3 medidas diferentes que fueron promediadas para obtener el resultado final.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron utilizando el programa PRISM 5.0 (GraphPad Software Inc.). Se realizó una t de Student para comparar dos grupos y un ANOVA de una sola vía o dos, seguido de una prueba post-hoc de Neuman-Keuls para comparar más de dos grupos, según proceda. En el caso de ser necesario, se realizó una correlación de Pearson y se procedió a un análisis de regresión lineal. Los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media (ESM) y una $p < 0.05$ se asumió como estadísticamente significativa

The background of the slide features a faint, light-colored map of Mexico. Overlaid on this map is a large, semi-transparent white number '4'. The word 'RESULTADOS' is written in a dark, serif font across the middle of the number '4'.

4 RESULTADOS

4.1 PAPEL DEL RECEPTOR AHR EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

4.1.1 Curso temporal de la expresión de AhR tras pMCAO en ratón

Con el fin de determinar posibles cambios en la expresión de AhR asociados a la isquemia, se llevó a cabo un estudio temporal de la expresión de dicho receptor en la zona infartada o *core* y en la región peri-infarto tras pMCAO (**Figura 4.1A**). El análisis mediante western blot para AhR (**Figura 4.1 B y C**) mostró una banda de 95 KDa que se corresponde al peso molecular descrito previamente en la literatura para el alelo AhR^b encontrado en los ratones C57BL/6J (Chang et al., 1993). A nivel de la región peri-infarto (**Figura 4.1, B**), se observó un incremento significativo en los niveles proteicos de AhR que comenzaba a las 5 horas en comparación con el grupo de animales sham. Este incremento alcanzó su nivel máximo a las 48 horas, comenzando a disminuir a partir de ese punto. En el *core* (**Figura 4.1, C**), los niveles se incrementaron significativamente a 5 horas, pero en menor medida que los observados en la región peri-infarto.

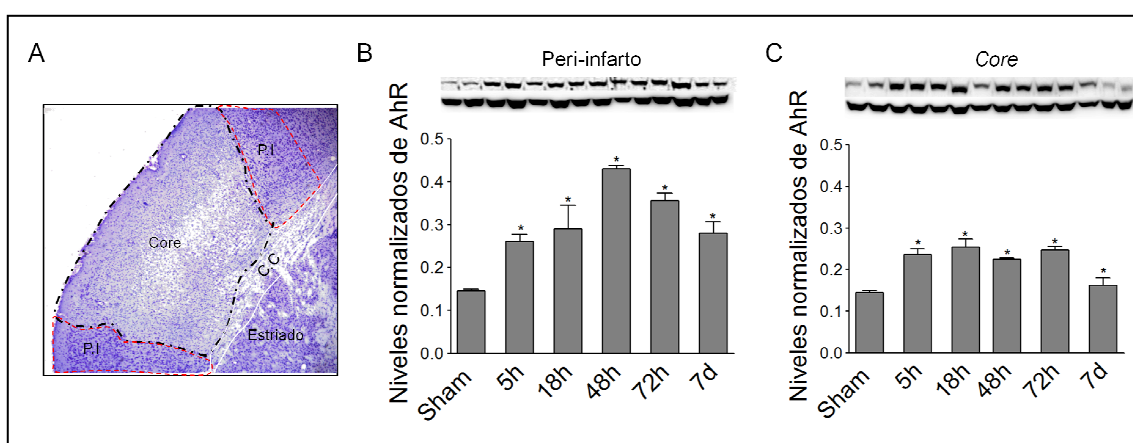


Figura 4.1. Curso temporal de la expresión de AhR tras pMCAO. (A) Imagen representativa de la corteza somatosensorial ipsilateral de ratón 24 h tras pMCAO teñida mediante Nissl, donde se muestra la región peri-infarto (PI) y el "core" o zona infartada; CC, cuerpo calloso (B-C) Expresión proteica de AhR determinada mediante western blot en la región peri-infarto (B) y en el "core" (C) (n=4 por grupo; *p<0.05 vs. Sham).

Este aumento en la expresión proteica de AhR se confirmó mediante inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para AhR en secciones coronales de cerebro de ratón a diferentes tiempos tras pMCAO, observándose un incremento progresivo en la intensidad de marcaje para AhR que se localizó de manera principal en células situadas en la región peri-infarto (**Figura 4.2**). La especificidad del marcaje en ambas metodologías se confirmó en animales "naïve" deficientes para AhR, en los que la ausencia de marcaje para el receptor validó la especificidad de la técnica empleada. Pese a las diferencias observadas a nivel de proteína para AhR, no detectamos un incremento similar en la expresión de AhR a nivel de ARN mensajero en ninguno de los tiempos analizados, por el contrario, se observó una disminución de dichos niveles a las 72h post-isquemia (datos no mostrados).

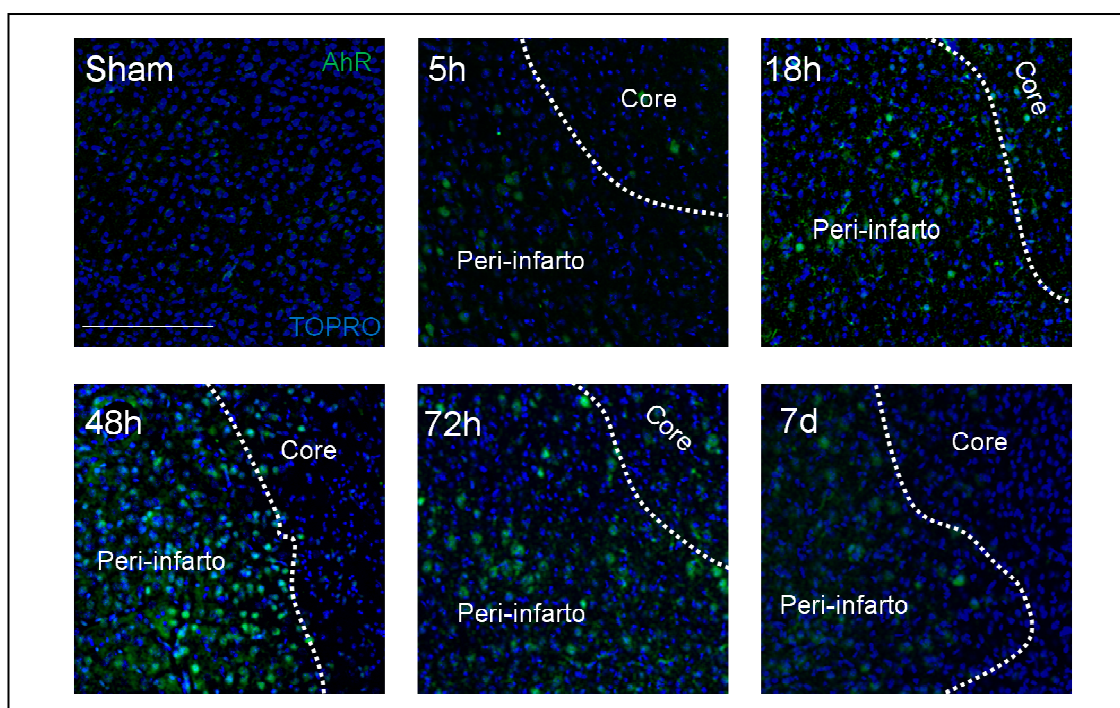


Figura 4.2. Análisis temporal de la expresión de AhR tras pMCAO. Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de AhR (verde) en combinación con el marcador de núcleos TOPRO (azul), a distintos tiempos tras la ischemia (Barra de escala = 100 μ m; n=4 por grupo).

Para determinar qué células son las responsables del incremento en la expresión de AhR tras pMCAO en ratón, se realizaron estudios de colocalización

mediante microscopía confocal de AhR (verde) con marcadores específicos para distintos tipos celulares (rojo) que incluían NeuN, como marcador de neuronas post-mitóticas, GFAP, como marcador de astrocitos, Iba1, como marcador de microglía, y NimpR14 como marcador de neutrófilos (**Figura 4.3, paneles A y B**).

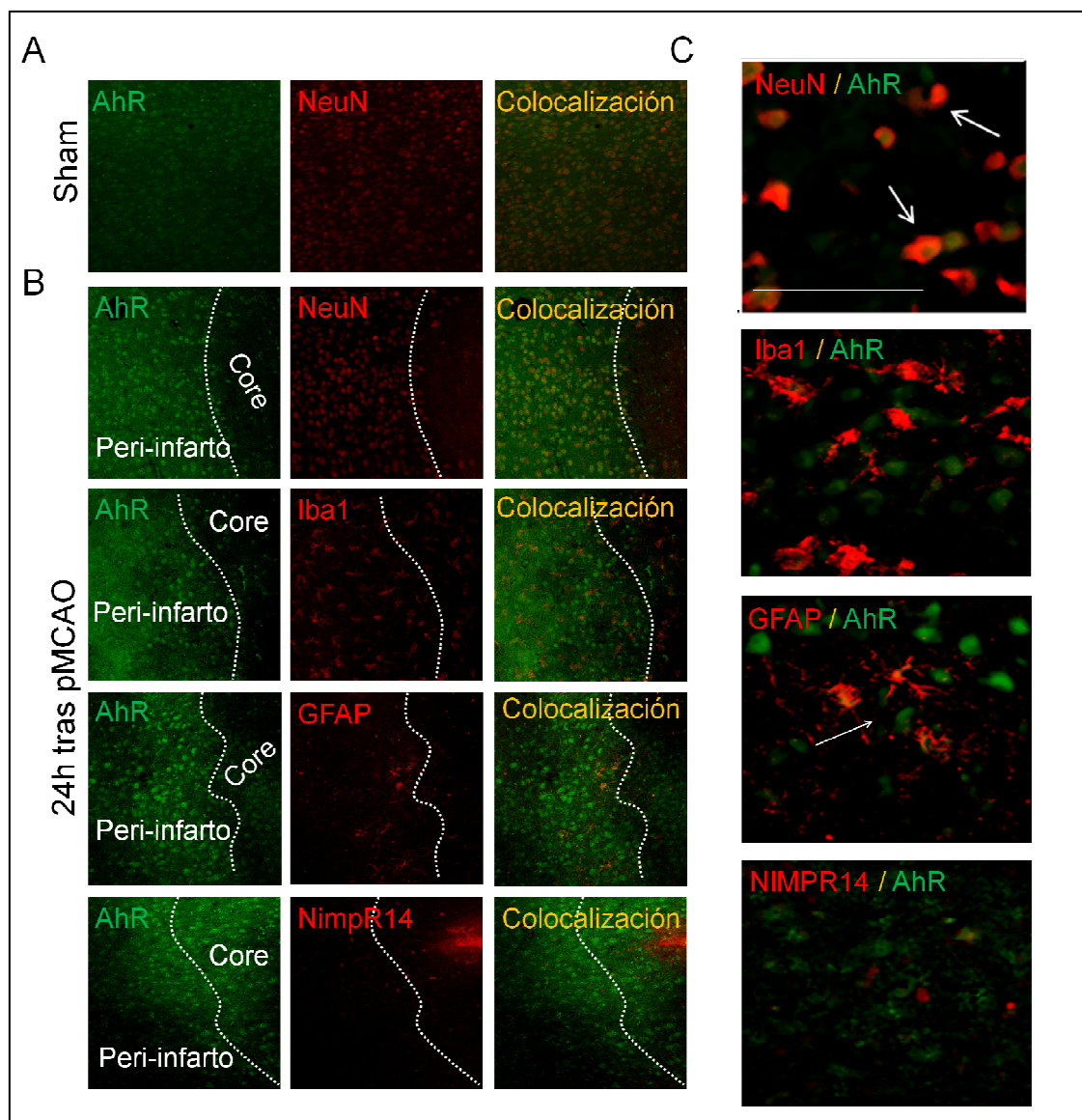


Figura 4.3. Localización celular de AhR tras pMCAO. Doble inmunofluorescencia de AhR (verde) en combinación con el marcador neuronal NeuN (rojo) en animales Sham (**A**) y animales pMCAO 24 h tras la oclusión (**B**), así como con el marcador de astrocitos GFAP (rojo), de microglía Iba1 (rojo) y de neutrófilos NIMP-R14 (rojo) en animales pMCAO 24 h tras la oclusión (**B**). En (**C**) se muestran ampliaciones de la zona peri-infarto, a excepción de la fotografía tomada para NIMP-R14 cuya localización es en el *core*, que muestran la colocalización de AhR con los distintos marcadores (Barra de escala = 100µm en A y B, y 50 µm en C).

Las micrografías obtenidas muestran claramente un incremento en la expresión de AhR en comparación con el grupo de animales sham. En ambos, la inmunoreactividad para AhR se localizó en neuronas (NeuN⁺) situadas principalmente a nivel de la corteza somatosensorial en el grupo de animales sham (**Figura 4.3, panel A**) y en la región peri-infarto en el grupo de animales isquémicos (**Figura 4.3, B y C**). De manera ocasional, también se observó la presencia de AhR en astrocitos reactivos, pero en ningún caso en células Iba1⁺ o NimpR14⁺ (**Figura 4.3 panel B y C**).

La expresión de AhR se analizó de manera simultánea en la corteza contralateral. Sorprendentemente, como se observa en la **Figura 4.4**, la isquemia indujo un incremento significativo a tiempos tardíos (comenzando a las 72h y alcanzando el pico a los 7 días) en la expresión del ARNm de AhR (**Figura 4.4, panel A**).

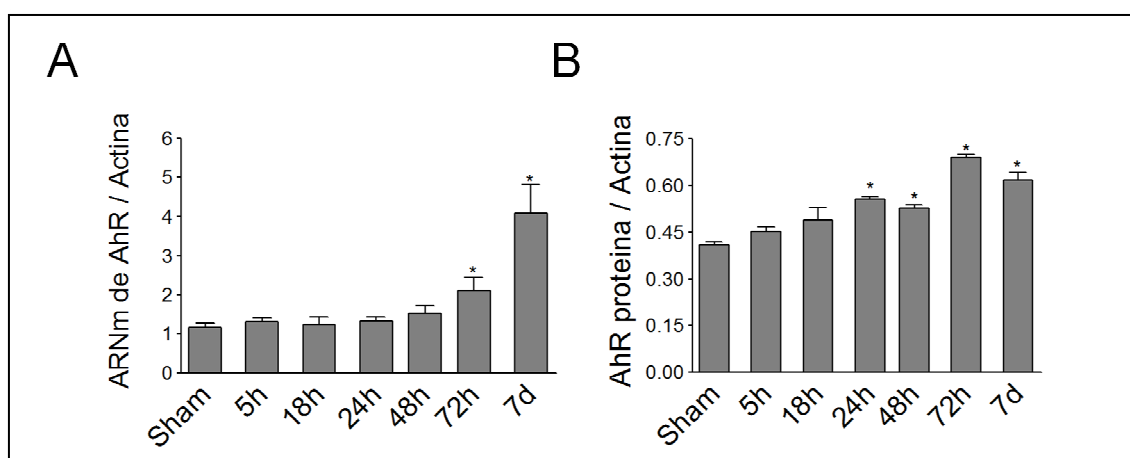


Figura 4.4. Expresión de AhR en la corteza somatosensorial contralateral tras pMCAO. (A) Niveles de ARNm de AhR a distintos tiempos tras la isquemia en la corteza somatosensorial contralateral (n=4 por grupo; *p<0.05 vs. Sham). **(B)** Análisis de la expresión proteica de AhR mediante western blot en la corteza somatosensorial contralateral (n=4 por grupo; *p<0.05 vs. Sham).

Este incremento se acompañó por un aumento similar en los niveles de proteína de AhR, detectable a partir de las 24 horas (**Figura 4.4, panel B**). El análisis mediante doble inmunofluorescencia de AhR en combinación con el marcador

neuronal NeuN confirmó lo observado mediante western blot, detectándose un incremento en la reactividad para AhR en neuronas situadas principalmente en las capas II/III y V de la corteza somatosensorial contralateral (**Figura 4.5**).

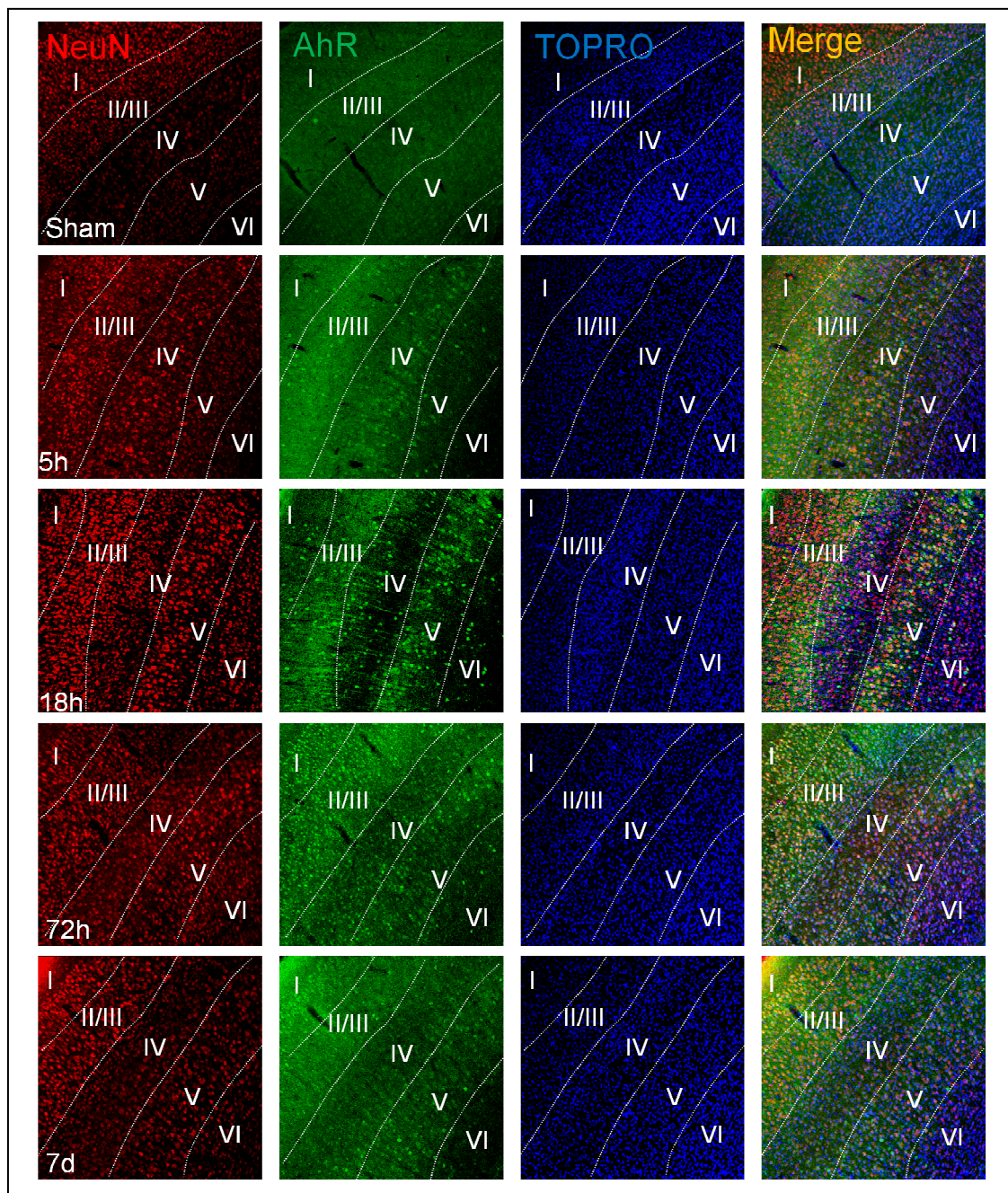


Figura 4.5. Expresión de AhR en la corteza somatosensorial contralateral tras pMCAO. Imágenes representativas de la doble inmunofluorescencia de AhR (verde) en combinación con el marcador neuronal NeuN (rojo) y el marcador de núcleos TOPRO (azul), a distintos tiempos tras pMCAO (n=4 por grupo). Las zonas delimitadas muestran las distintas capas de la corteza somatosensorial.

Este marcaje era detectable a 5 horas post-isquemia. Igualmente, aunque los datos no se han mostrado en este estudio, un cambio similar en lo referente a la corteza somatosensorial contralateral se observa en la corteza ipsilateral somatosensorial sana, así como en el estriado, mostrando cada una de las regiones analizadas un patrón temporal específico. En la **Figura 4.6** se esquematizan los cambios temporales observados tras pMCAO y las regiones afectadas.

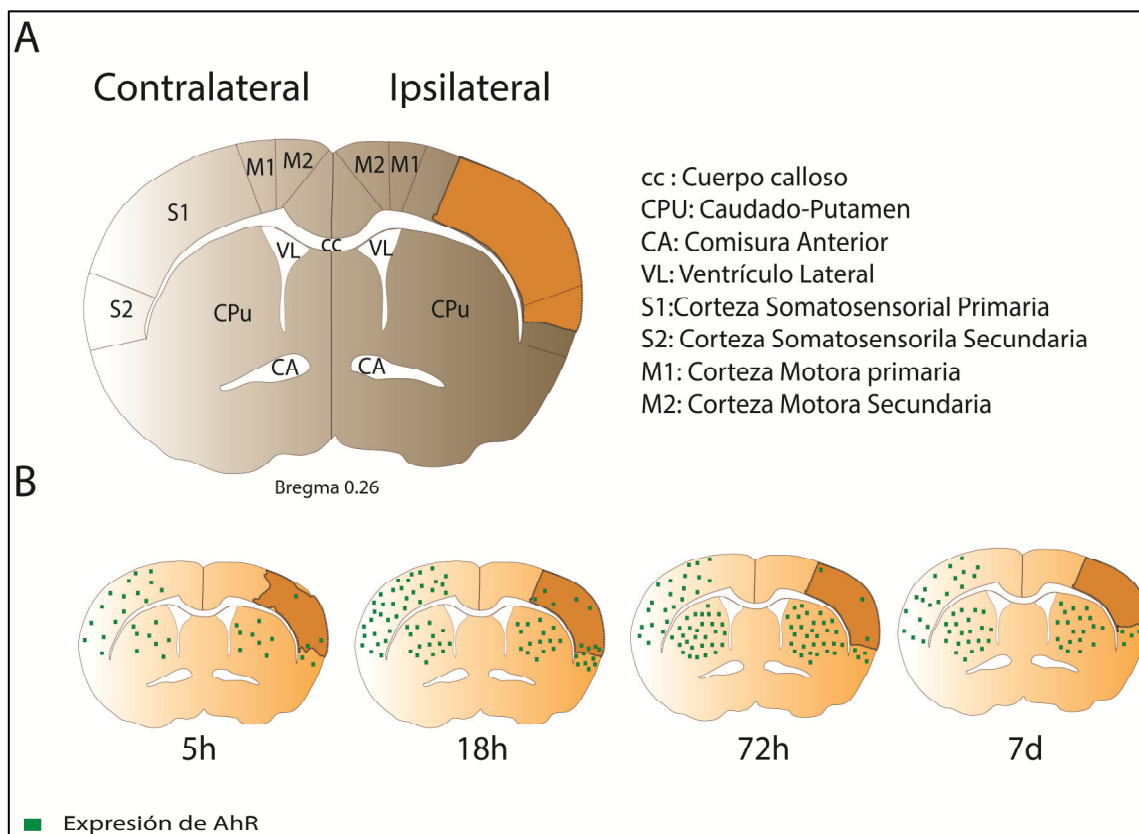


Figura 4.6. Diagrama representativo de la expresión de AhR tras ischemia en las distintas regiones del cerebro de ratón. (A) Vista frontal de una sección coronal de cerebro de ratón a la altura de bregma 0.26 (ver Paxinos de ratón., 2006) donde se marcan el hemisferio contralateral (derecho) y el hemisferio ipsilateral (izquierdo), así como la región infartada o *core* (amarillo). En la figura se aprecia cómo la lesión afecta principalmente a las cortezas somatosensoriales primarias, no existiendo afectación del estriado (CPU) y del cuerpo calloso (cc). **(B)** Expresión de AhR (cuadrados verdes) en el cerebro de ratón tras pMCAO a 5, 18, 72 horas y 7 días. Como se observa en la figura, a nivel de la corteza somatosensorial contralateral e ipsilateral sana, la expresión incrementa de 5 a 18 horas, empezando a disminuir a partir de las 72 horas. De manera simultánea al incremento en la expresión a nivel de S1 y S2 contralateral e ipsilateral, se observa un incremento en la expresión en los estriados que alcanza su punto máximo a las 72 horas.

4.1.2 Expresión de AhR en cultivos primarios de neuronas de rata tras OGD

Los experimentos *in vivo* presentados anteriormente mostraban un incremento en los niveles de expresión de AhR tras isquemia cerebral que se localizaban de manera principal en las neuronas. Por este motivo, decidimos caracterizar si un proceso similar se produce *in vitro* exponiendo a los cultivos neuronales a la privación de oxígeno y glucosa. Para ello, cultivos primarios de neuronas corticales de rata de 12-14 DIV se sometieron a OGD durante 150 minutos y se reperfundieron durante 24 horas. A ese tiempo, se procedió a la inmunodetección mediante western blot de AhR en neuronas control y neuronas OGD (Figura 4.7, A).

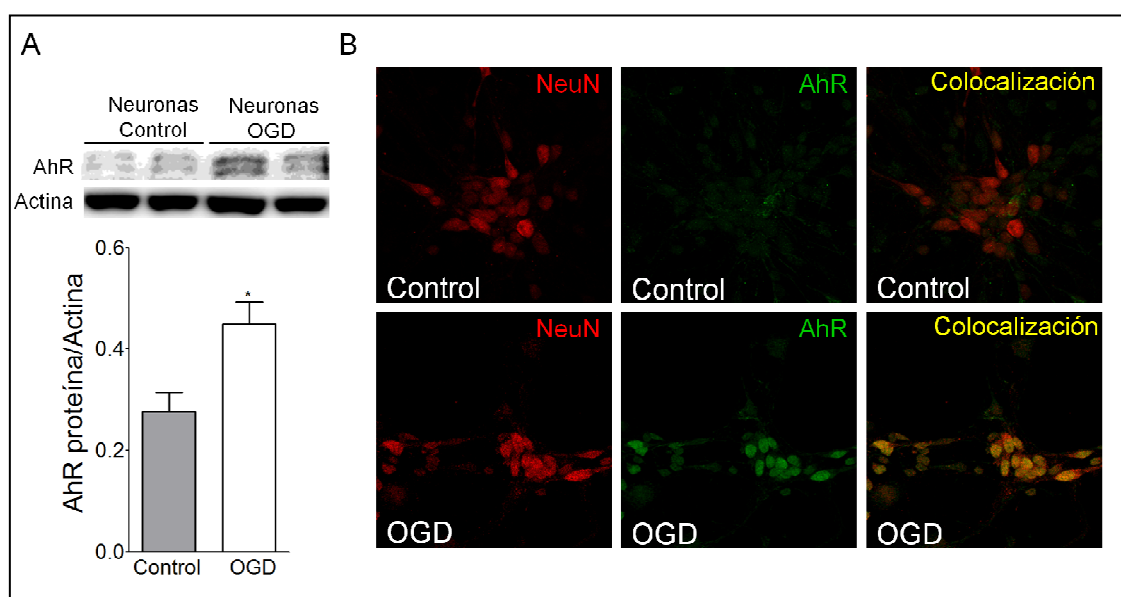


Figura 4.7. Expresión de AhR en cultivos primarios de neuronas de rata tras privación de oxígeno y glucosa. (A) Análisis de los niveles de proteína de AhR mediante western blot en neuronas control y neuronas OGD 24 horas tras la reperusión. En el panel superior se muestra una imagen representativa de la inmunodetección de AhR mediante *immunoblot*. La gráfica inferior muestra el resultado de la cuantificación densitométrica de AhR normalizado por los niveles de actina de cada muestra (* $p < 0.05$ vs neuronas control; $n = 8$ por grupo). (B) Microfotografías representativas obtenidas 24h tras la reperusión de las neuronas control (panel superior) y neuronas OGD (panel inferior). Las imágenes corresponden a fotografías obtenidas mediante microscopía confocal en donde se muestra la expresión de AhR (verde) en neuronas control y el incremento experimentado por las mismas tras la exposición a la OGD. En rojo se muestra el marcaje obtenido para el marcador neuronal NeuN ($n = 6$ por grupo).

El anticuerpo específico para AhR detectó en los cultivos de neuronas puras de rata dos bandas de pesos aproximados de 105 y 95 KDa. Estas bandas se corresponden con los dos alelos para AhR descritos en la literatura para ratas Wistar (Jiang et al., 2009). Como se muestra en la **Figura 4.7A**, la cuantificación densitométrica de ambas bandas mostró un incremento significativo de los niveles de AhR en las neuronas sometidas a OGD que llegan a doblar los valores obtenidos en las neuronas control, manteniéndose estables los niveles de actina en los grupos analizados. Además, el análisis de inmunofluorescencia de los cultivos primarios mediante anticuerpos para AhR y para neuronas (NeuN) permitió confirmar los resultados anteriores (**Figura 4.7, panel B**). En las neuronas control se observa una tinción difusa de AhR, mientras que la exposición de los cultivos a la OGD produce un claro incremento en la intensidad de la señal para AhR, que empieza a ser detectable a tiempos de reperusión cortos como 5h (datos no mostrados), y resulta completamente evidente a 24h.

4.1.3 Perfil temporal de activación de AhR tras pMCAO en ratón

Tras el estímulo por un agonista, un evento crucial para que AhR pueda ejercer su acción como factor de transcripción es la traslocación del receptor al compartimento nuclear (Barouki et al., 2012; Barouki et al., 2007; Guyot et al., 2012). En base a esto, quisimos determinar si el incremento en la expresión de AhR observado tras la isquemia lleva asociado un incremento de la localización nuclear de AhR en el cerebro isquémico. Para ello, se realizó un estudio temporal de la expresión de AhR mediante western blot en las fracciones citosólica y nuclear obtenidas a partir de la zona infartada + zona peri-infarto (**Figura 4.8, paneles A-B**). En los animales sham, los niveles de AhR permanecieron en un ratio aproximado 1:1 entre núcleo y citoplasma. Este hecho se ha descrito previamente para determinados tipos celulares en los

cuales, en ausencia de ligando, AhR se distribuye de manera homogénea entre núcleo – citoplasma (Ikuta et al., 2000; Pollenz et al., 1994). Sin embargo, 18 horas tras pMCAO, la localización de AhR es mayoritariamente nuclear, permaneciendo así hasta las 72 horas y volviendo al cociente 1:1 a los 7 días tras la isquemia.

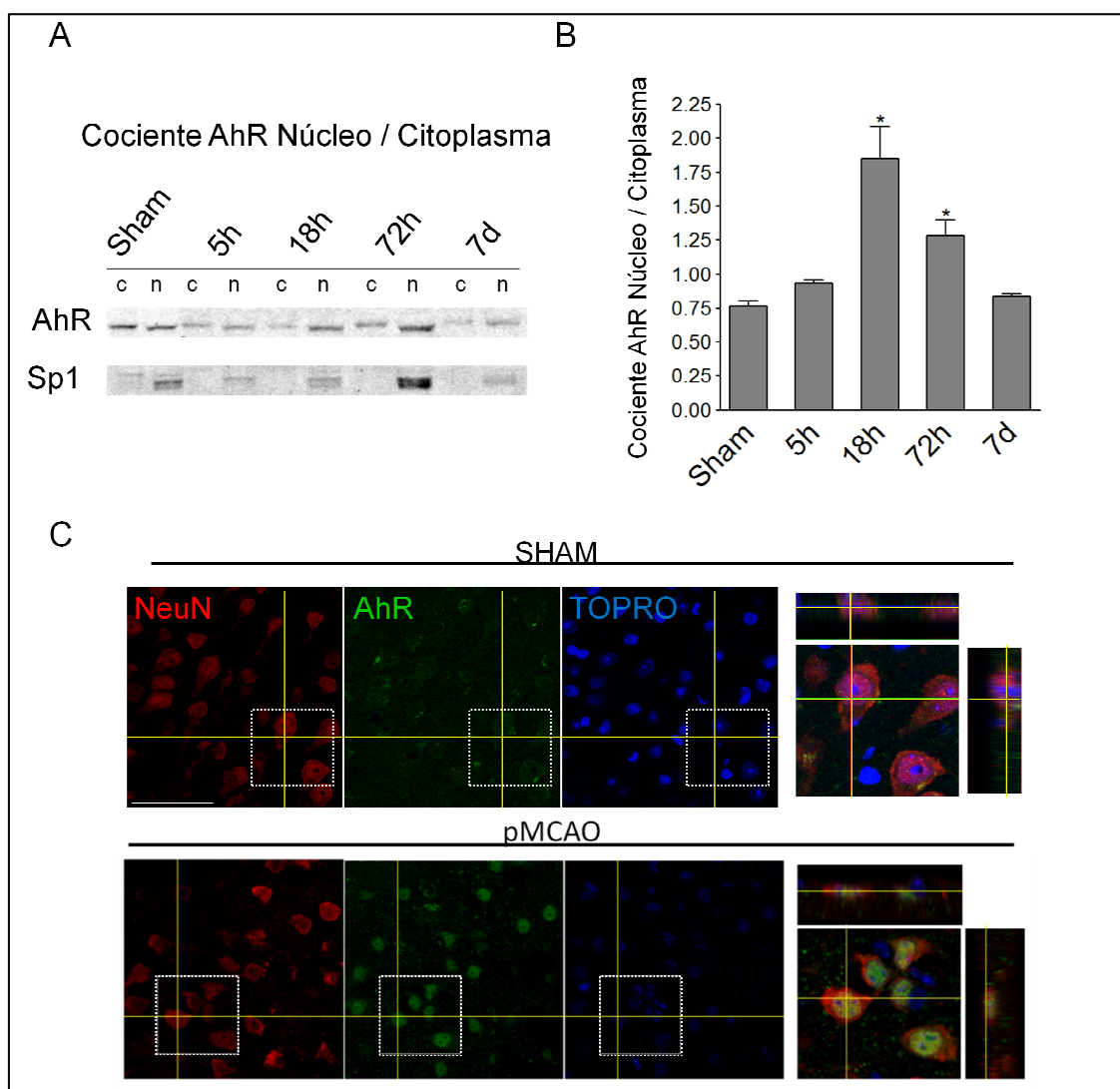


Figura 4.8. Análisis de la traslocación al núcleo de AhR tras isquemia cerebral. En (A) y (B), se muestra la expresión de AhR mediante *western blot* en las fracciones nucleares y citosólicas obtenidas a partir de tejido de la zona peri-infarto + core a distintos tiempos tras la oclusión de la arteria cerebral media. La cuantificación del cociente núcleo (n)/citoplasma(c) de AhR muestra la proporción relativa de AhR en el compartimento nuclear. Los niveles de Sp1 se utilizaron para estimar la pureza de las fracciones nucleares. Los niveles de actina sirvieron como control de carga (n=4 por grupo; *p<0.05 vs. Sham). (C) Micrografías representativas de la colocalización de AhR (verde) en neuronas (rojo), en animales sham (panel superior) y animales pMCAO 18 horas después de la isquemia (panel inferior). En azul se muestra el compartimento nuclear mediante el marcador TOPRO. Los paneles de la derecha muestran las proyecciones ortogonales de las zonas delimitadas (Barra de escala=50µm).

Como se observa en la **Figura 4.8 (panel C)**, el análisis por microscopía confocal de AhR (verde) en combinación con NeuN (rojo) 18 horas después de la inducción de la isquemia mostró un marcaje para AhR difuso en el grupo de animales sham que se distribuía entre el núcleo y citoplasma de las neuronas (**Figura 4.8, panel C superior**). Por el contrario, la isquemia indujo claramente un cambio de localización de AhR (**Figura 4.8, C panel inferior**), situándose de manera mayoritaria en el compartimento nuclear (azul), como se observa de manera evidente en las proyecciones ortogonales (**Figura 4.8, C, paneles de la derecha**).

Una vez en el núcleo, para regular a nivel transcripcional la expresión de sus genes diana, AhR necesita formar un heterodímero funcional con otro factor de transcripción (Oesch-Bartlomowicz y Oesch, 2009). Como se comentó previamente en la Introducción, una de las principales proteínas descritas para la formación del heterodímero es ARNT. En base a esto, decidimos evaluar si ARNT está presente en el cerebro, y si experimenta cambios en sus niveles de expresión a consecuencia de la isquemia.

Como se observa en la **Figura 4.9, A**, el análisis mediante western blot de ARNT en el cerebro isquémico mostró un ligero incremento significativo en la expresión de ARNT en la región peri-infarto a las 18 horas que se mantuvo constante hasta las 72 horas post-isquemia. A diferencia de los patrones de expresión de AhR, el mayor incremento en ARNT se observó en el *core* (**Figura 4.9, B**), en donde su expresión incrementó de manera gradual de 18 a 72 horas y disminuyó a los 7 días.

A nivel del peri-infarto, los estudios de inmunofluorescencia de ARNT (verde), en combinación con NeuN (rojo), muestran la presencia de ARNT en el núcleo (azul) de neuronas situadas en la región peri-infarto (**Figura 4.9, C**). Estudios preliminares de co-inmunoprecipitación de AhR en extractos nucleares

obtenidos a las 72 horas post-isquemia, mostraron la interacción de AhR con ARNT (**Figura 4.9, D**). Aunque no han sido analizados los restantes tiempos, es probable que esta interacción se observe también a las 18 horas, punto máximo de traslocación de AhR al núcleo tras la ischemia.

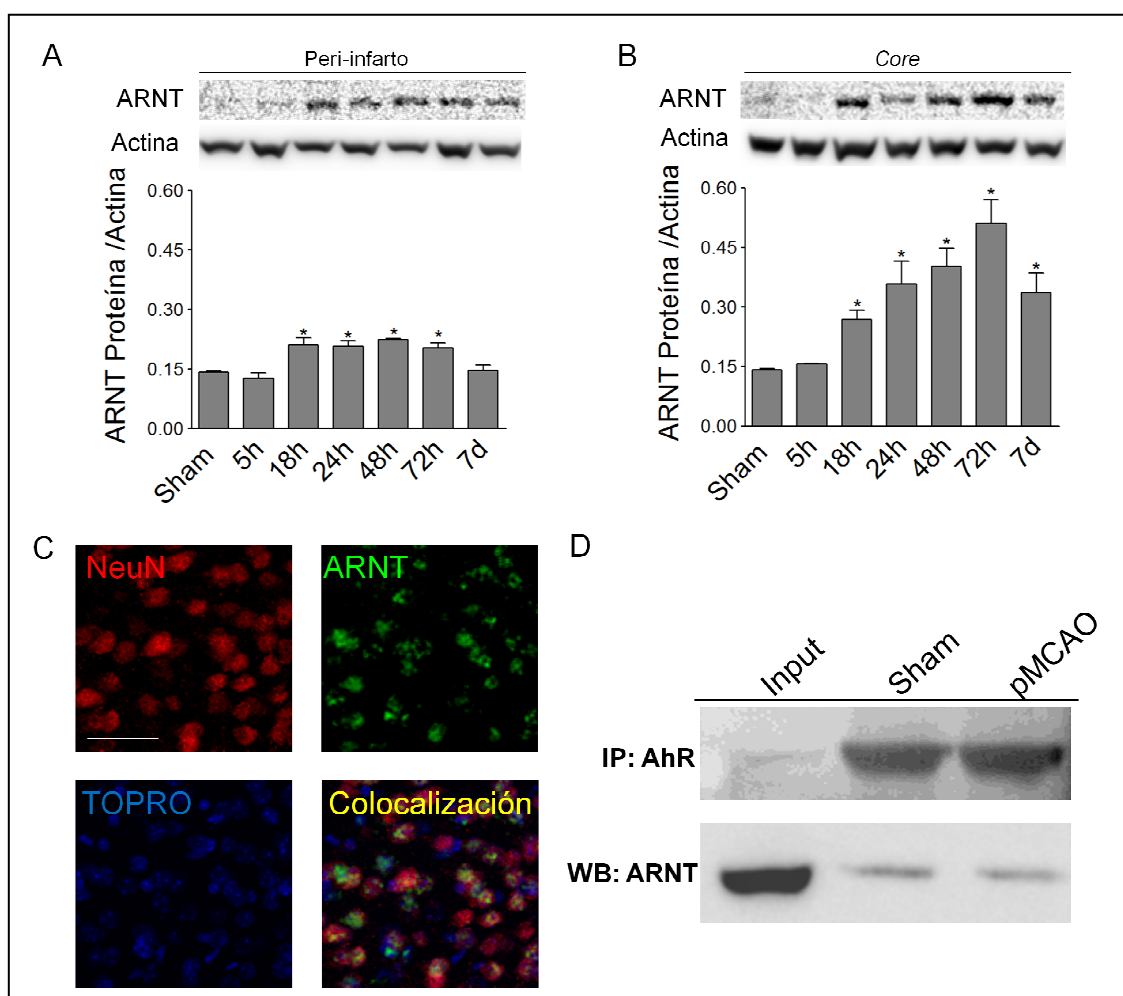


Figura 4.9. Caracterización de ARNT en el cerebro tras pMCAO. Inmunodetección de los niveles de ARNT tras diferentes tiempos de la oclusión de la ACM en las regiones de peri-infarto (**A**), y *core* (**B**) (* $p < 0.05$ vs. sham; $n = 4$ por grupo). (**C**) Imágenes representativas de la doble inmunofluorescencia para ARNT (verde) en combinación con NeuN (rojo) y el marcador nuclear TOPRO (azul), en la región peri-infarto de animales sacrificados 18 horas tras pMCAO. ($n = 3$ por grupo; barra de escala = 50 μm). (**D**) Co-inmunoprecipitación de AhR mediante anticuerpos específicos en animales sham y pMCAO 72 horas tras la cirugía. Los complejos inmunoprecipitados se detectó la presencia de ARNT ($n = 2$ por grupo); Input (extracto total), IP (inmunoprecipitación) y WB (western blot).

Por último, evaluamos 2 de los principales genes diana de AhR, Cyp1A1 y AhRR, en el cerebro isquémico a distintos tiempos tras la pMCAO (**Figura 4.10**).

Ambos genes diana incrementaron su expresión de manera notable 18 horas tras la isquemia. Por tanto, este resultado confirma que el incremento en la expresión de AhR y su cambio de localización en las neuronas, se acompaña también, por un incremento en su actividad transcripcional.

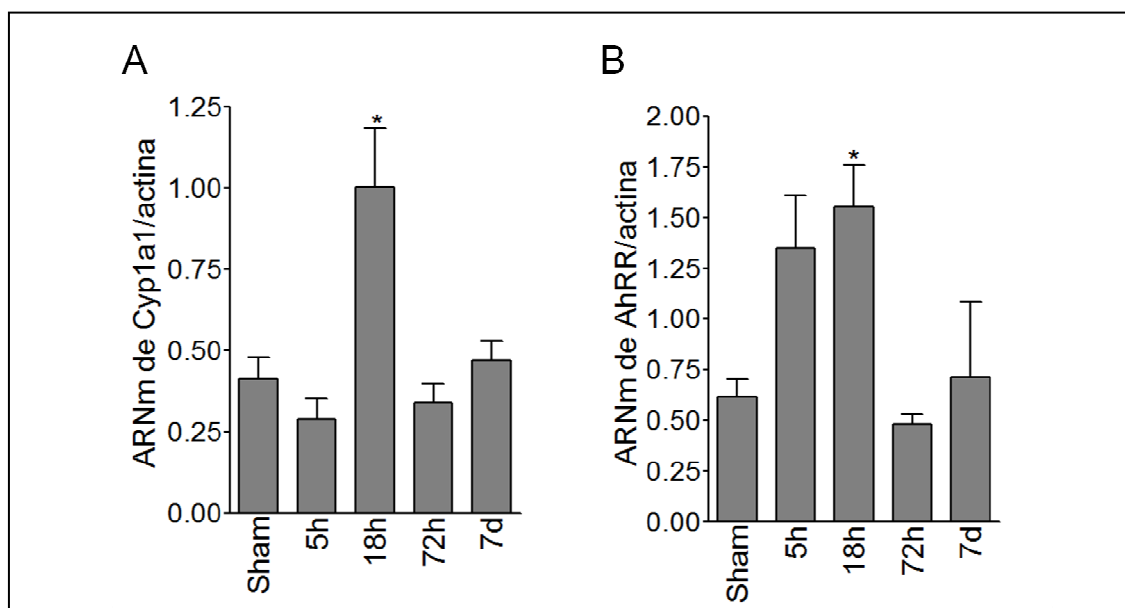


Figura 4.10. Regulación de genes diana de AhR tras isquemia. Evaluación de la expresión del ARNm de 2 de los principales genes diana de AhR, el gen Cyp1A1 (A) y el gen AhRR (B), evaluados en la región peri-infarto + *core* 16 horas tras la oclusión de la arteria cerebral media. Los valores se representan normalizados por la expresión de actina (n=6 por grupo; *p<0.05 vs. Sham).

4.1.4 Activación de AhR en cultivos primarios de neuronas de rata tras OGD

De manera similar al estudio *in vivo*, decidimos examinar si, en nuestro modelo de isquemia *in vitro*, el incremento de la expresión de AhR se acompañaba por un incremento en su actividad como factor de transcripción. Para ello, en primer lugar analizamos la expresión de AhR en las fracciones nuclear y citoplasmática de neuronas corticales control o sometidas a OGD 3 horas tras la reperusión (**Figura 4.11**).

De acuerdo con lo observado en el modelo *in vivo*, la isquemia incrementó la traslocación de AhR al compartimento nuclear de las neuronas.

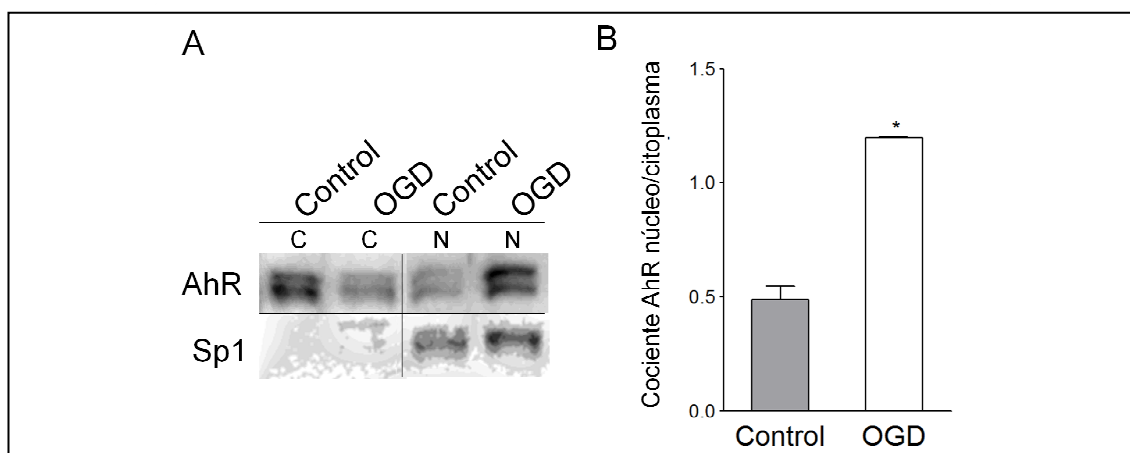


Figura 4.11. Efecto de la exposición a OGD sobre la localización de AhR en cultivos corticales de neuronas de rata. Detección de los niveles nucleares (N) y citoplasmáticos (C) de AhR en neuronas control y neuronas OGD, 3h tras el fin de la OGD. **(A)** Imagen representativa de los resultados obtenidos mediante el western blot. Los niveles de Sp1 se utilizaron para determinar la pureza de las fracciones nucleares. **(B)** Cuantificación densitométrica de AhR en las fracciones nuclear y citosólica, representado como el cociente de AhR núcleo/citoplasma (* $p < 0.05$ vs. neuronas control; $n = 6$ por grupo).

Para confirmar este resultado, se llevó a cabo el análisis mediante inmunofluorescencia de AhR en los cultivos primarios, a distintos tiempos tras la reperusión, y se cuantificó densitométricamente la señal positiva para AhR en los núcleos neuronales identificados como TOPRO positivos a través del programa ImageJ.

Como se observa en la **Figura 4.12**, en las neuronas control, la intensidad media de fluorescencia en el núcleo para AhR permaneció constante de 30 minutos a 3 horas tras la OGD, observándose una disminución de la fluorescencia a las 24 horas. A diferencia, las neuronas sometidas a la privación de oxígeno y glucosa experimentaron un incremento significativo de la intensidad media de fluorescencia para AhR en el grupo de 3 y 24 horas tras la OGD (**Figura 4.12, C-F**) en el compartimento nuclear, cuando lo comparamos con el grupo control.

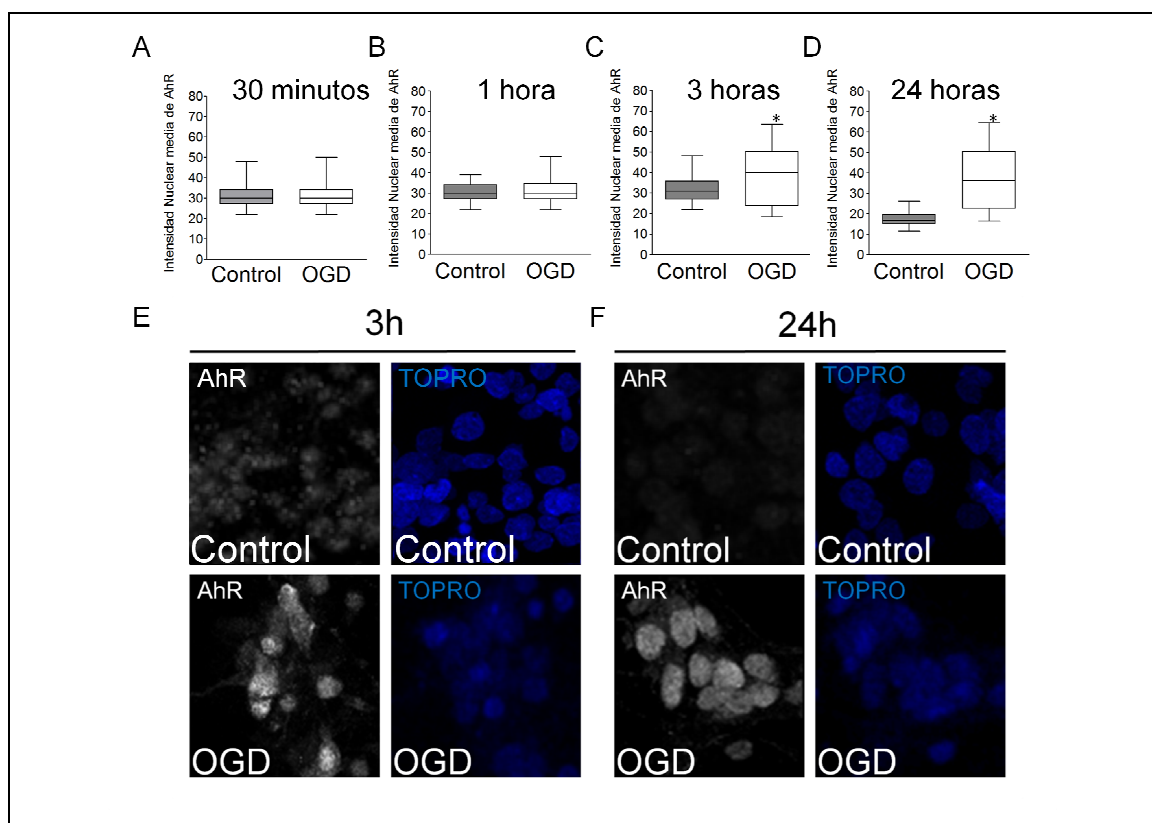


Figura 4.12. Expresión de AhR en el compartimento nuclear de neuronas sometidas a OGD. (A-D) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia para AhR determinada mediante la delimitación manual de los núcleos TOPRO⁺. La distribución de los datos se representa mediante plots de caja, en donde se muestra la mediana junto con los percentiles del 25 y el 75 %. Las barras señalan la posición de los centiles de 90 y 10. La cuantificación fue realizada a 30 minutos (A), 1 hora (B), 3 horas (C) y 24 horas (D) tras la OGD. En todos los casos, la cuantificación se realizó en al menos 200 núcleos de 6 experimentos distintos (* $p < 0.05$ vs neuronas control). (E y F) Imágenes representativas de neuronas control (paneles superiores) y neuronas OGD (panel inferiores) a 3 horas (E) y 24 horas (F) tras la OGD.

4.1.5 Efecto de la pérdida de función de AhR con antagonistas específicos o tras la delección génica del receptor sobre el volumen de infarto y los síntomas sensorimotores

Con el fin de evaluar el papel de AhR tras la isquemia cerebral, animales C57BL/6 fueron sometidos a pMCAO, y tratados 10 minutos después de la oclusión permanente con vehículo (DMSO 100%) o con el antagonista puro de AhR, 6,2',4'-trimetoxiflavona (TMF) (Murray et al., 2010a). Aunque este compuesto ha sido utilizado numerosas ocasiones en modelos *in vitro* para antagonizar la actividad de AhR (DiNatale et al., 2011; 2012; Murray et al.,

2010a), su administración *in vivo* así como su biodisponibilidad tras su administración no han sido evaluadas. Dada la baja solubilidad del compuesto, decidimos utilizar la dosis de 5 mg/Kg de TMF (**Figura 1.13**).

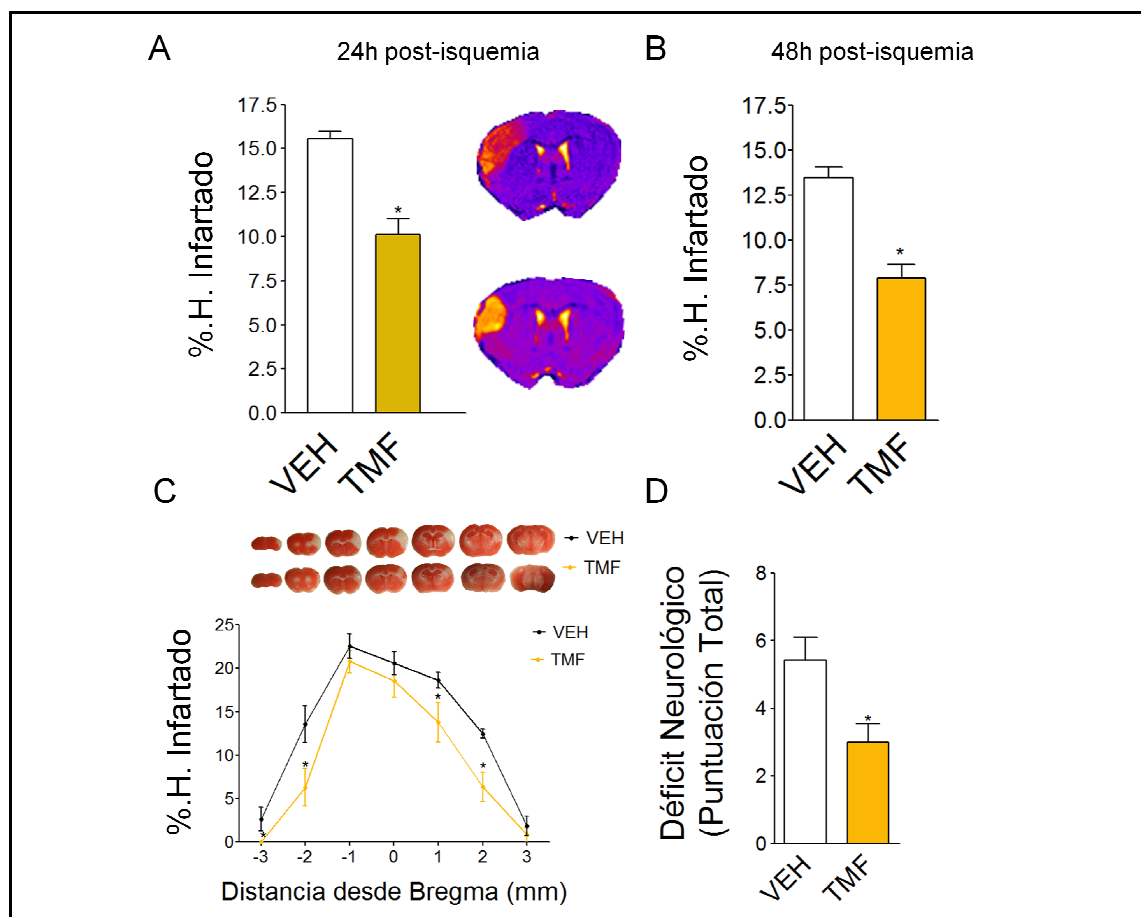


Figura 4.13. Efecto de la administración en fase aguda del antagonista de AhR 6,2',4'-trimetoxiflavona en el volumen de infarto y en los déficits neurológicos. Efecto del antagonista TMF (5 mg/Kg) en el volumen de infarto (**A-C**) determinado 24 horas tras pMCAO mediante resonancia magnética (**A**) o mediante tinción TTC (**B-C**) 48 horas después de la oclusión, representado como % total de hemisferio infartado (**B**) o como % de hemisferio infartado a lo largo del eje antero-posterior (**C**). En (**D**) se muestra la evaluación de los déficits motores y sensoriales 48 horas tras la inducción de la isquemia. VEH (pMCAO + vehículo); TMF (pMCAO + 6,2',4'-trimetoxiflavona) (n=9 por grupo; *p<0.05 vs. pMCAO vehículo).

Como se observa en la **Figura 4.13**, la administración de TMF produjo una reducción significativa en el volumen de infarto en comparación con el grupo de animales vehículo, determinado a las 24 h por resonancia magnética (**Figura 4.13, panel A**), así como a las 48 horas mediante tinción con TTC (**Figura 4.13, paneles B y C**). Acorde con la reducción observada en el volumen de infarto, el

tratamiento en fase aguda con TMF redujo los déficits neurológicos a las 48 horas post-isquemia evaluados mediante la escala mNSS (**Figura 4.13, panel D**).

Decidimos confirmar el resultado obtenido con el antagonista TMF utilizando un antagonista distinto que previamente había sido administrado *in vivo* (Petroff et al., 2011). Este compuesto, el CH223191 (CH), es un antagonista puro de AhR que se caracteriza por competir con ligandos de AhR de tipo HAHs, pero no de tipo PAHs (Choi et al., 2012; Zhao et al., 2010). El compuesto fue administrado 10 minutos tras la pMCAO en dos dosis diferentes, 5 y 10 mg/Kg, en base a lo descrito en la literatura (Petroff et al., 2011).

Como se observa en la **Figura 4.14**, la dosis de CH de 10 mg/Kg produjo una reducción significativa del tamaño del infarto en comparación con los animales tratados con vehículo, al evaluarse el volumen de infarto mediante TTC 48 horas tras la oclusión. Esta reducción no se observó en los tratados con la dosis de 5 mg/Kg de CH.

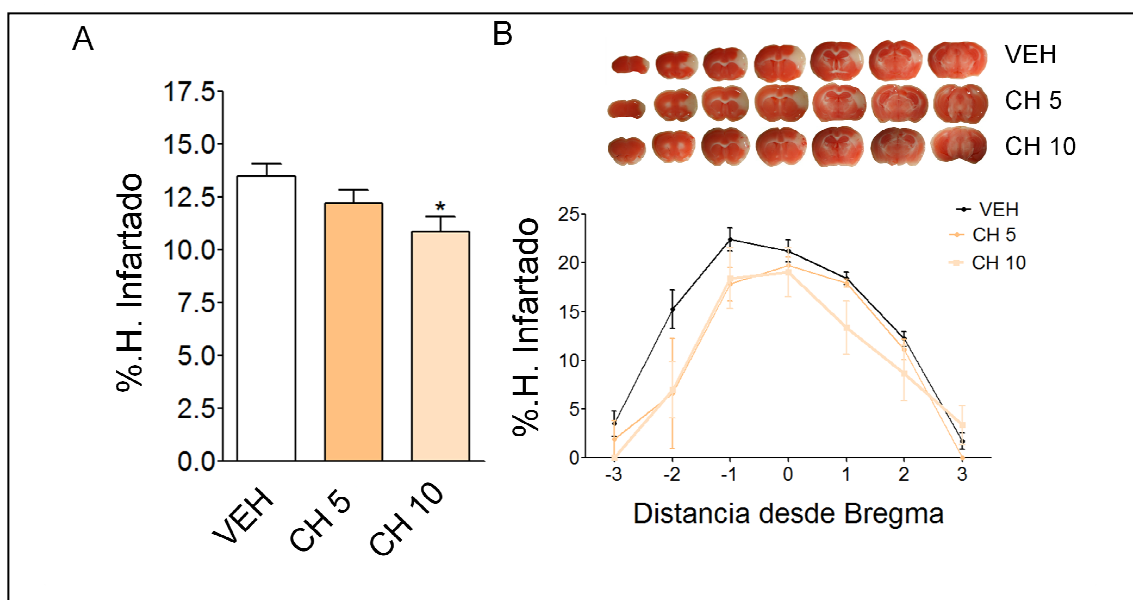


Figura 4.14. Efecto de la administración en fase aguda del antagonista de AhR, CH223191, en el volumen de infarto. (A) y (B) Efecto en el volumen de infarto, del antagonista CH223191 (5 y 10 mg/Kg), determinado 48 horas tras pMCAO mediante tinción TTC y representado como % total de hemisferio infartado (A) o como % de hemisferio infartado a lo largo del eje antero-posterior (B). VEH (pMCAO + vehículo); CH 5 (pMCAO + CH223191 5 mg/Kg); CH 10 (pMCAO + CH223191 10 mg/Kg) (n=7-9 por grupo; *p<0.05 vs. pMCAO vehículo).

Ya que el efecto producido por la TMF en el volumen de infarto en la dosis de 5mg/Kg fue mayor que el producido por CH229133 en una dosis mayor, en los experimentos subsiguientes que requirieran el empleo de un antagonista de AhR, se seleccionó la TMF en base a su mejor respuesta neuroprotectora.

Para confirmar los resultados obtenidos en el volumen de infarto y en los déficits neurológicos tras el tratamiento con antagonistas específicos de AhR, animales WT (AhR^{+/+}) y animales deficientes en AhR (AhR^{-/-}) se sometieron a la oclusión de la ACM.

Como se comentó previamente en la Introducción, los animales AhR^{-/-} presentan una alta tasa de mortalidad a consecuencia de su alta susceptibilidad a parásitos oportunistas (Sanchez et al., 2010; Shi et al., 2007). Este hecho, sumado a los problemas de fertilidad encontrados en las hembras AhR^{-/-} y a la alta tasa de mortalidad prenatal de los ratones AhR^{-/-}, junto con el reducido número de animales AhR^{-/-} que sobreviven al periodo de lactancia (Abbott et al., 1999), dificultó la tarea de conseguir un grupo de animales macho AhR^{-/-} de edad comprendida entre las 10-12 semanas para evaluar el volumen de infarto y en los déficits neurológicos. Finalmente, obtuvimos 7 ratones AhR^{-/-} macho de 3 meses de edad, que fueron sometidos a pMCAO junto con sus respectivos controles (ratones WT AhR^{+/+}). Mientras que los 7 ratones AhR^{+/+} sobrevivieron hasta las 48h post-MCAO (el % de mortalidad del modelo de isquemia utilizado se estima en aproximadamente un 2% en ratones normales), de los 7 ratones AhR^{-/-}, 5 murieron entre 2-4 horas post-MCAO, y en los dos restantes se realizó la medida del volumen del infarto. Los resultados obtenidos fueron sumamente dispares, siendo el infarto en uno de los animales de tipo hemisférico, con un porcentaje de hemisferio infartado del 48,6%, y de 10,4% para el otro animal superviviente. En el caso de los animales WT, el volumen de infarto resultante fue de $16,2 \pm 1,5\%$ de hemisferio infartado.

Por tanto, ante la imposibilidad de evaluar el efecto de la delección génica de AhR en la isquemia cerebral, decidimos determinar el efecto de la eliminación parcial de AhR en los ratones heterocigotos (AhR^{+/-}). Estos ratones no presentan los defectos observados en los ratones nulos para AhR, presentando una tasa de mortalidad similar a la de los ratones WT. Como se observa en la **Figura 4.15 (panel A)**, la delección parcial de AhR conlleva una reducción del 70% en los niveles de proteína de AhR determinados en extractos preparados a partir de la región peri-infarto y *core* de animales sometidos a pMCAO. Esta reducción se observó de manera similar mediante inmunofluorescencia (**Figura 4.15, panel B**) de AhR (verde) en combinación con NeuN (Rojo).

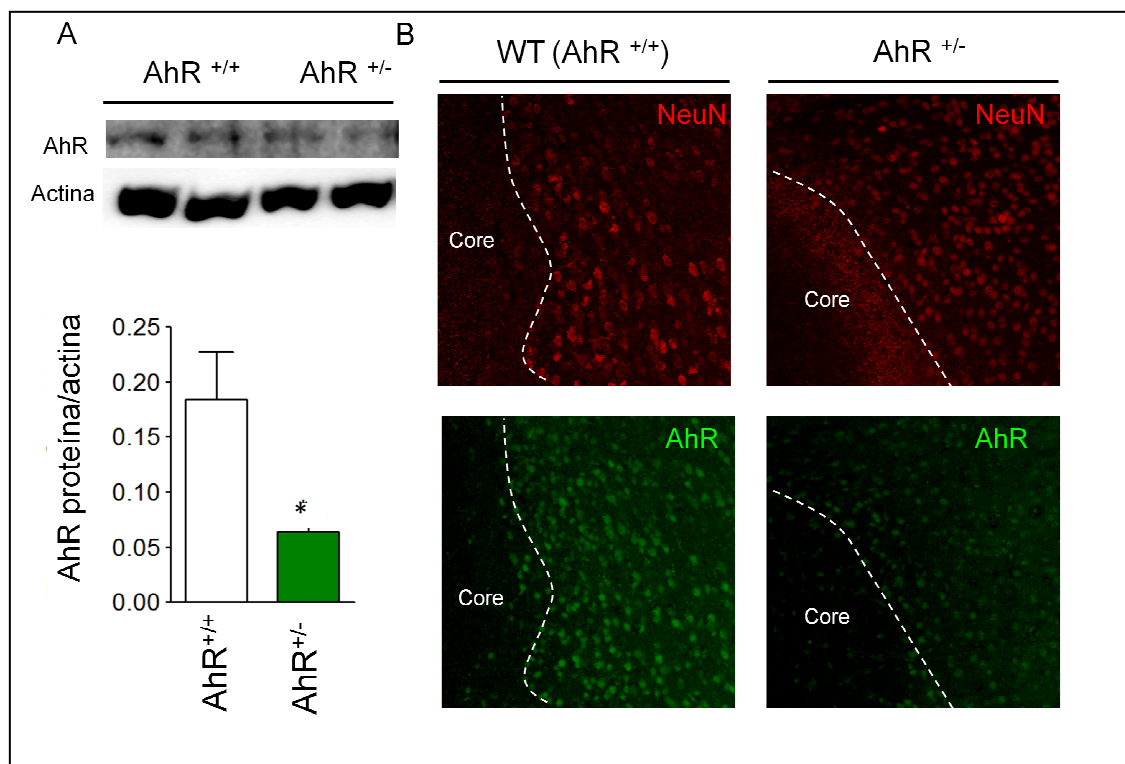


Figura 4.15. Expresión de AhR en animales AhR^{+/-} sometidos a pMCAO. (A) Niveles de expresión de AhR 24 tras pMCAO en la región peri-infarto + *core* de animales salvajes para AhR (AhR^{+/+}) y animales heterocigotos para AhR (AhR^{+/-}), determinados mediante western blot (n=6 por grupo; *p<0.05 versus pMCAO WT). (B) Fotografías representativas de doble inmunofluorescencia de AhR (verde) con el marcador neuronal NeuN (rojo) de animales salvajes para AhR (panel izquierdo) y animales heterocigotos para AhR (panel derecho), 24 h tras pMCAO. En las imágenes se delimitan la región de *core* y peri-infarto.

La evaluación del volumen del infarto en los ratones WT y ratones $AhR^{+/-}$ se realizó a las 48 horas mediante TTC (**Figura 4.16**).

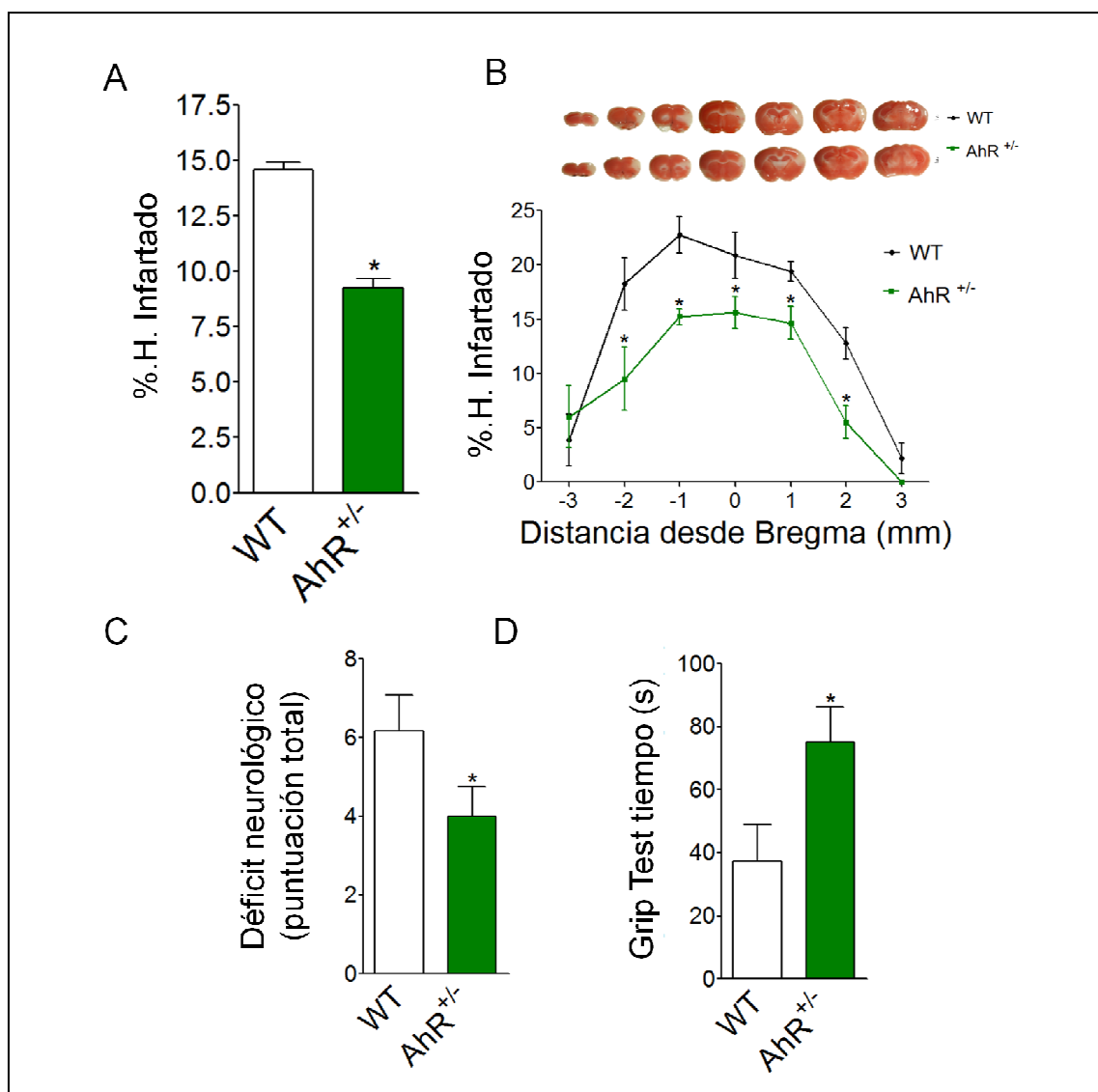


Figura 4.16. Efecto de la delección parcial de AhR sobre el volumen de infarto 48 h tras pMCAO. **(A)** Efecto de la ausencia parcial de AhR en el volumen de infarto representado como % total de hemisferio infartado o **(B)** a lo largo del eje rostro-caudal. **(C)** Evaluación de los déficits neurológicos según la escala mNSS en ratones WT para AhR y ratones $AhR^{+/-}$. **(D)** Evaluación del tiempo de latencia en caer en los ratones WT y $AhR^{+/-}$ a la hora de realizar el “grip test”. El ensayo tuvo una duración total de 100 segundos ($n=9$ por grupo; $*p<0.05$ vs. WT).

Como se aprecia en la **Figura 4.16 (paneles A y B)**, la delección génica parcial de AhR disminuyó significativamente el volumen del infarto en comparación con sus respectivos controles WT. Esta disminución se distribuyó de manera homogénea a lo largo de todo el eje rostro-caudal (**Figura 4.16, B**). La

evaluación de los déficits neurológicos a través de la escala *mNSS* (**Figura 4.16, panel C**) mostró una clara reducción de los síntomas motores y sensitivos en los ratones heterocigotos a las 48 horas tras pMCAO. De igual forma, los animales heterocigotos para AhR mostraron un incremento en el tiempo de latencia en caer en comparación con los animales salvajes, cuando se sometieron al “grip Test” (**Figura 4.16, panel D**).

Estos resultados, en conjunto con los observados previamente con el tratamiento de antagonistas específicos para AhR, sugieren que este receptor juega un papel deletéreo en la fase aguda del ictus experimental.

4.1.6 Efecto de la inhibición de AhR mediante un antagonista específico tras OGD o tras exposición a NMDA en cultivos primarios de neuronas de rata

Para validar los resultados obtenidos *in vivo* en nuestro modelo *in vitro*, las neuronas se sometieron a un pre-tratamiento con vehículo o con el antagonista de AhR TMF, a una concentración de 3, 5 y 10 μM durante 24 horas, antes de la OGD (**Figura 4.17**).

24 horas tras la reperusión se analizó el % de liberación de LDH como marcador de viabilidad neuronal. Como se muestra en la **Figura 4.17A**, y confirmando lo descrito previamente en otros tipos celulares (DiNatale et al., 2012), el antagonista de AhR TMF no presentó efectos de tipo citotóxico en las neuronas control en ninguna de las concentraciones utilizadas para el ensayo.

De manera similar a lo observado *in vivo*, la administración con TMF previa a la inducción de la OGD (**Figura 4.17, panel B**), redujo significativamente el % de liberación de LDH en las concentraciones 5 y 10 μM , en comparación con las neuronas OGD tratadas con vehículo, mostrando un efecto concentración dependiente. De igual forma, la administración de TMF a una concentración 10 μM durante la OGD y las 24 horas de reperusión (**Figura 4.17, panel C**),

disminuyó la liberación de LDH con respecto a las neuronas tratadas con vehículo.

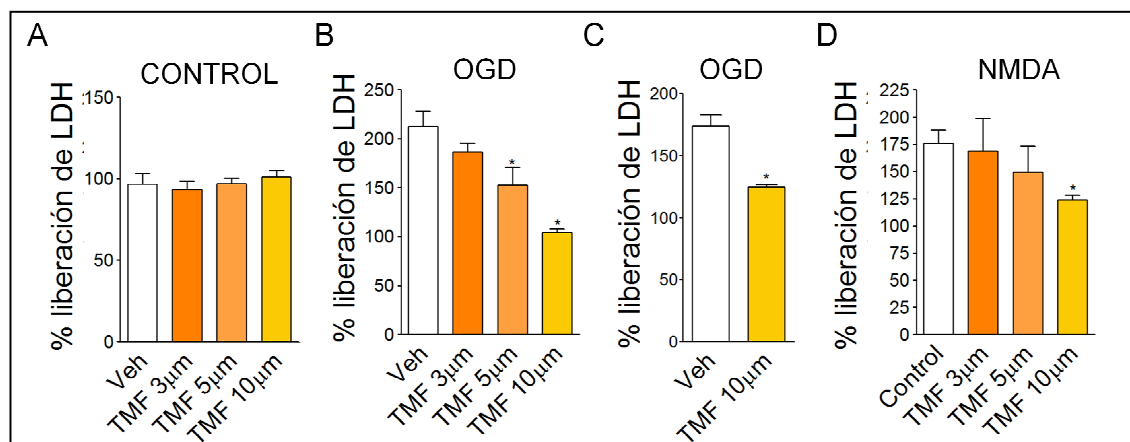


Figura 4.17. Efecto del antagonista de AhR TMF en la viabilidad celular de neuronas control y neuronas sometidas a OGD o al tratamiento con NMDA. (A) Neuronas control tratadas con vehículo y TMF (6,2',4'-trimetoxiflavona) a diferentes concentraciones (3, 5 y 10 μ M), con el fin de evaluar la posible citotoxicidad del tratamiento. La liberación de LDH se determinó a las 24 horas del inicio del tratamiento. (B) % de liberación de LDH con respecto a las neuronas control, en neuronas pre-tratadas con vehículo o TMF a distintas concentraciones (3, 5 y 10 μ M) 24 horas antes de la inducción de la OGD. La liberación de LDH se calculó 24 horas tras la OGD (n=12 réplicas por grupo, 3 experimentos distintos; *p<0.05 vs. neuronas OGD vehículo). (C) % de liberación de LDH con respecto a las neuronas control, en neuronas tratadas con vehículo o TMF 10 μ M durante la OGD y las 24 horas de perfusión. La liberación de LDH se estimó 24 horas tras la OGD (n=12 réplicas por grupo, 3 experimentos distintos; *p<0.05 vs. neuronas OGD vehículo). (D) % de liberación de LDH con respecto a las neuronas control, en neuronas pre-tratadas con vehículo o TMF a diferentes concentraciones, 24 horas antes del tratamiento con NMDA (100 μ M) + glicina (10 μ M). La liberación de LDH se estimó 24 horas tras la exposición a NMDA. (n=12 réplicas por grupo, 3 experimentos distintos; *p<0.05 vs. neuronas NMDA vehículo).

Ya que uno de los pasos fundamentales en la muerte neuronal tras la isquemia es la excitotoxicidad por sobreactivación de los receptores NMDA (Choi, 1988a; Choi et al., 1988), quisimos determinar si el tratamiento previo con TMF era capaz de proteger a las neuronas de concentraciones tóxicas de NMDA. Para ello, las neuronas fueron pre-tratadas con vehículo o TMF a distintas concentraciones, y se trataron con NMDA (100 μ M) junto con su co-agonista glicina (10 μ M) en una solución libre de Mg^{2+} . Como podemos observar en la **Figura 4.17D**, la exposición a una dosis tóxica de NMDA incrementó el % de liberación de LDH en las neuronas tratadas con vehículo. Este efecto se vio

reducido cuando las neuronas fueron pre-tratadas con TMF a la concentración 10 μ M. El resto de las concentraciones de TMF utilizadas en el ensayo no produjo diferencias significativas con respecto al control tratado con vehículo.

Por tanto, de manera similar a lo observado *in vivo*, la inhibición de AhR en cultivo puros de neuronas ejerce un efecto neuroprotector ante una isquemia experimental así como ante la excitotoxicidad mediada por sobreactivación de los receptores NMDA.

4.2 L-KINURENINA COMO POSIBLE LIGANDO ENDÓGENO DE AHR EN ISQUEMIA CEREBRAL

4.2.1 Perfil temporal de la concentración cerebral y plasmática de L-triptófano y L-kinurenina tras pMCAO en ratón

Ya que el metabolito L-kinurenina derivado de la degradación del triptófano a través de la ruta de las kinureninas es un ligando endógeno de AhR (Adams et al., 2012; DiNatale et al., 2010; Hao et al., 2013; McBerry et al., 2012; Opitz et al., 2011) y, como comentamos en la Introducción, tras un ictus isquémico los principales metabolitos de esta vía se encuentran alterados (Darlington et al., 2007; Gold et al., 2011), decidimos comprobar si, en nuestro modelo de isquemia cerebral, la activación de AhR mostrada previamente era mediada por un incremento en los niveles cerebrales de L-kinurenina, el metabolito limitante de la ruta.

Para ello, gracias a una colaboración con el profesor Andrew Harkin, analizamos mediante HPLC los niveles de L-triptófano y L-kinurenina en el cerebro y en el plasma de animales sometidos a pMCAO a diferentes tiempos tras la oclusión (**Figura 4.18**).

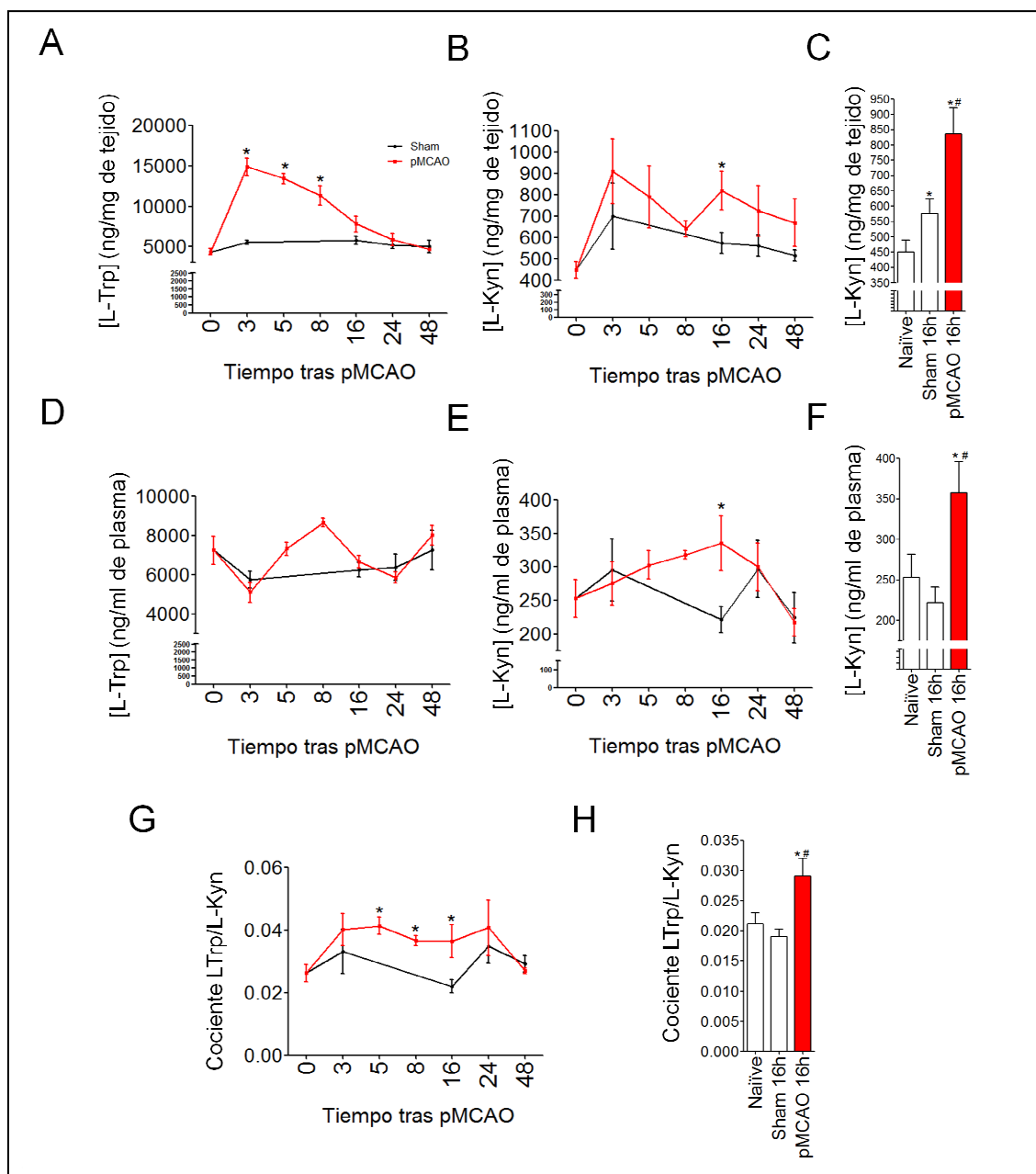


Figura 4.18. Curso temporal de los niveles de L-triptófano y L-kinurenina tras isquemia cerebral. (A) Concentración de triptófano (L-Trp) en el cerebro isquémico a distintos tiempos tras pMCAO. Los valores se representan como ng de triptófano por mg de tejido (n=4 por grupo; *p<0.05 vs. naïve; #p<0.05 vs. sham). (B) Concentración de L-kinurenina (L-Kyn) en el cerebro isquémico a distintos tiempos tras pMCAO. Los valores se representan como ng de L-kinurenina por mg de tejido (n=4 por grupo; *p<0.05 vs. naïve). (C) Concentración de L-kinurenina en el cerebro isquémico 16h tras pMCAO (D) Concentración plasmática de triptófano a distintos tiempos tras pMCAO. Los valores se representan como ng de triptófano por ml de plasma (n=7-8 por grupo; *p<0.05 vs. naïve; #p<0.05 vs. sham). (E) Concentración plasmática de L-kinurenina en plasma a distintos tiempos tras pMCAO. Los valores se representan como ng de L-kinurenina por mg de tejido (n=7-8 por grupo; *p<0.05 vs. naïve; #p<0.05 vs. sham). (F) Concentración plasmática de L-kinurenina 16h tras pMCAO (n=8 por grupo; *p<0.05 vs. naïve; #p<0.05 vs. sham) (G-H) Cociente de L-kinurenina/triptófano en plasma a diferentes tiempos (G) y 16h (H) tras pMCAO (n=8 por grupo; *p<0.05 vs. naïve; #p<0.05 vs. sham).

Como se observa la **Figura 4.18A**, 3 horas tras la isquemia se produjo un incremento significativo en la concentración de triptófano en el cerebro en comparación con los animales naïve y sham. Este incremento declinó a las 8h y retornó a los niveles normales a las 48h tras la oclusión.

A diferencia, la concentración de L-kinurenina en el cerebro (**Figura 4.18, B y C**) mostró dos picos de inducción: un pico temprano que comenzó a las 3 horas y retornó casi a los niveles basales a las 8 horas tras la oclusión. Este incremento resultó significativo con respecto a los animales naïve, pero no en comparación con los animales sham. Por tanto este efecto no es específico de la isquemia. El segundo incremento en la concentración de L-kinurenina se observó 16 horas tras la oclusión, siendo significativo en comparación con su respectivo grupo de animales sham (**Figura 4.18 B y C**).

En plasma (**Figura 4.18 D-H**), no encontramos diferencias en los niveles de triptófano a los diferentes tiempos analizados (**Figura 4.18D**), sin embargo, los niveles de L-kinurenina (**Figura 4.18 D y E**) se comportaron de manera similar a lo observado en el cerebro, mostrando un aumento entre las 5 y 16h tras la pMCAO. Este incremento se observó también al representar los niveles como el cociente L-Kyn/triptófano (**Figura 4.18 G y H**).

4.2.2 Expresión de las enzimas que sintetizan L-kinurenina en el cerebro de ratón tras pMCAO

Aunque de manera mayoritaria la L-kinurenina encontrada en el cerebro proviene de la periferia, este metabolito del triptófano puede ser también originado de manera local en el cerebro por los astrocitos, la microglía y determinados tipos neuronales (Gál and Sherman, 1980). El precursor inmediato de la L-kinurenina, la formil-kinurenina, se genera a partir de la actividad enzimática de la TDO y la IDO. Este es un producto altamente

inestable que es rápidamente transformado a L-kinurenina, por lo que la actividad de estas dos enzimas determina los niveles de L-kinurenina (Guillemin et al., 2007; 2005). En base a esto, quisimos determinar si la isquemia induce cambios en los niveles de estas dos enzimas. Para ello, analizamos mediante RT-PCR los niveles de ARNm de IDO1, IDO2 y TDO en animales sham y pMCAO 5 horas tras la oclusión (**Figura 4.19**).

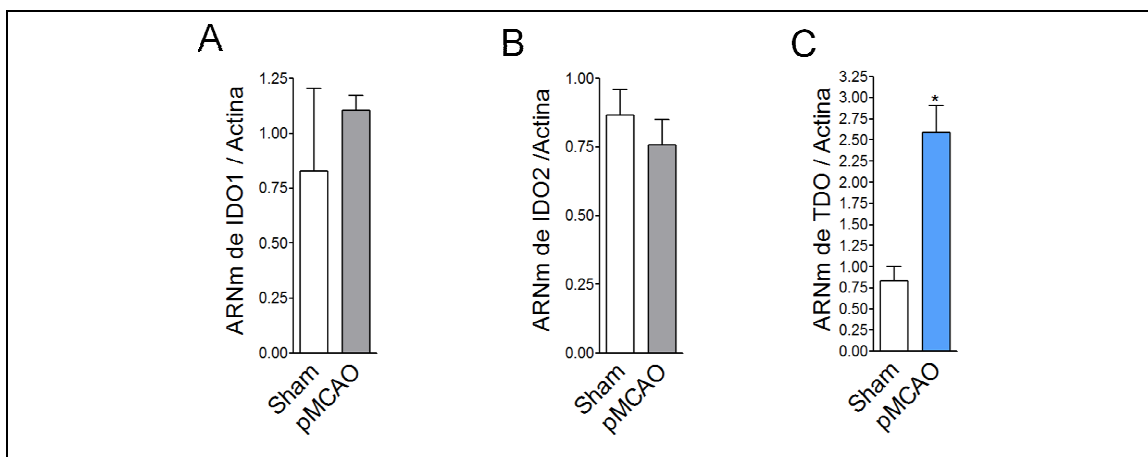


Figura 4.19. Expresión de las enzimas indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) y triptófano-2,3 dioxigenasa (TDO) tras isquemia cerebral experimental en ratón. Análisis mediante RT-PCR del ARNm de la enzima IDO1 (**A**), IDO2 (**B**) y TDO en la región de peri-infarto + *core* de animales sometidos a pMCAO 5 horas tras la oclusión. Los valores se presentan como % de inducción vs. grupo de animales sham (* $p < 0.05$ vs. sham; $n = 6$ por grupo).

Mientras que no fuimos capaces de observar cambios en la expresión de ambas isoformas de la enzima IDO (**Figura 4.19A-B**), la isquemia incrementó los niveles de ARNm de la enzima TDO en comparación con el grupo de animales sham (**Figura 4.19C**). Estos resultados sugieren que el metabolismo de la ruta de las kinureninas se encuentra incrementado tras la isquemia tanto a nivel periférico como a nivel local en el cerebro.

4.2.3 Activación de AhR mediada por el metabolito L-kinurenina en modelos experimentales de isquemia cerebral *in vivo* e *in vitro*

Dado el incremento observado en el posible agonista endógeno de AhR L-kinurenina tras la isquemia cerebral en el cerebro de ratón, decidimos

determinar si el tratamiento de los cultivos neuronales con L-kinurenina incrementaba la traslocación de AhR al núcleo. Para ello, realizamos estudios de inmunofluorescencia de la traslocación de AhR al compartimento nuclear en neuronas control y neuronas OGD tratadas con L-kinurenina a diferentes tiempos tras la reperusión (**Figura 4.21**). Para estos estudios, se utilizaron como control positivo neuronas control tratadas con el agonista de AhR TCDD. La concentración de L-kinurenina utilizada fue de 50 μ M, elegida en base a los estudios previamente publicados (Opitz et al., 2011).

En condiciones basales, la concentración de L-kinurenina no presentó efectos citotóxicos en las neuronas corticales de rata evaluados mediante la liberación de LDH a diferentes tiempos tras el tratamiento (**Figura 4.20**). Sin embargo, el agonista TCDD a la dosis de 10 nM, incrementó la liberación de LDH en neuronas control, tal y como se ha descrito en estudios previos sobre la neurotoxicidad mediada por TCDD.

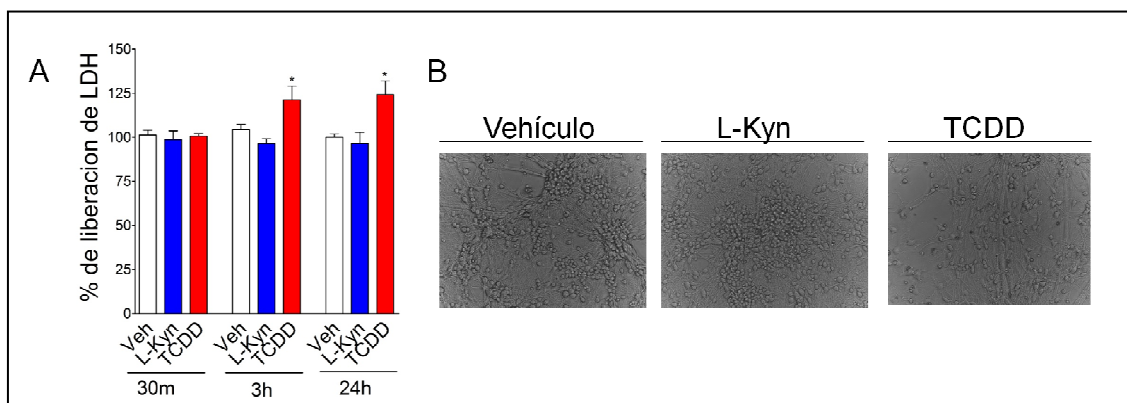


Figura 4.20. Efecto de los agonistas de AhR, L-kinurenina y TCDD en la viabilidad celular de neuronas control. Neuronas control tratadas con vehículo, L-kinurenina (L-Kyn) 50 μ M y TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-P-dioxina) 10nM con el fin de evaluar la posible citotoxicidad del tratamiento. La liberación de LDH se evaluó a 30 minutos, 3 y 24 horas tras el tratamiento. Los resultados se representan como el % de liberación de LDH vs. neuronas control + vehículo (* $p < 0.05$ vs. neuronas control + vehículo; $n = 8$ réplicas por condición; 3 experimentos distintos).

Al evaluar el efecto en la traslocación de AhR de ambos agonistas, el tratamiento con TCDD indujo una rápida respuesta en la traslocación de AhR, observable 30 minutos tras el tratamiento (**Figura 4.21, A**). Esta respuesta se

mantuvo hasta las 3 horas y se igualó a los niveles de las neuronas control a las 24 horas (**Figura 4.21, B-D**).

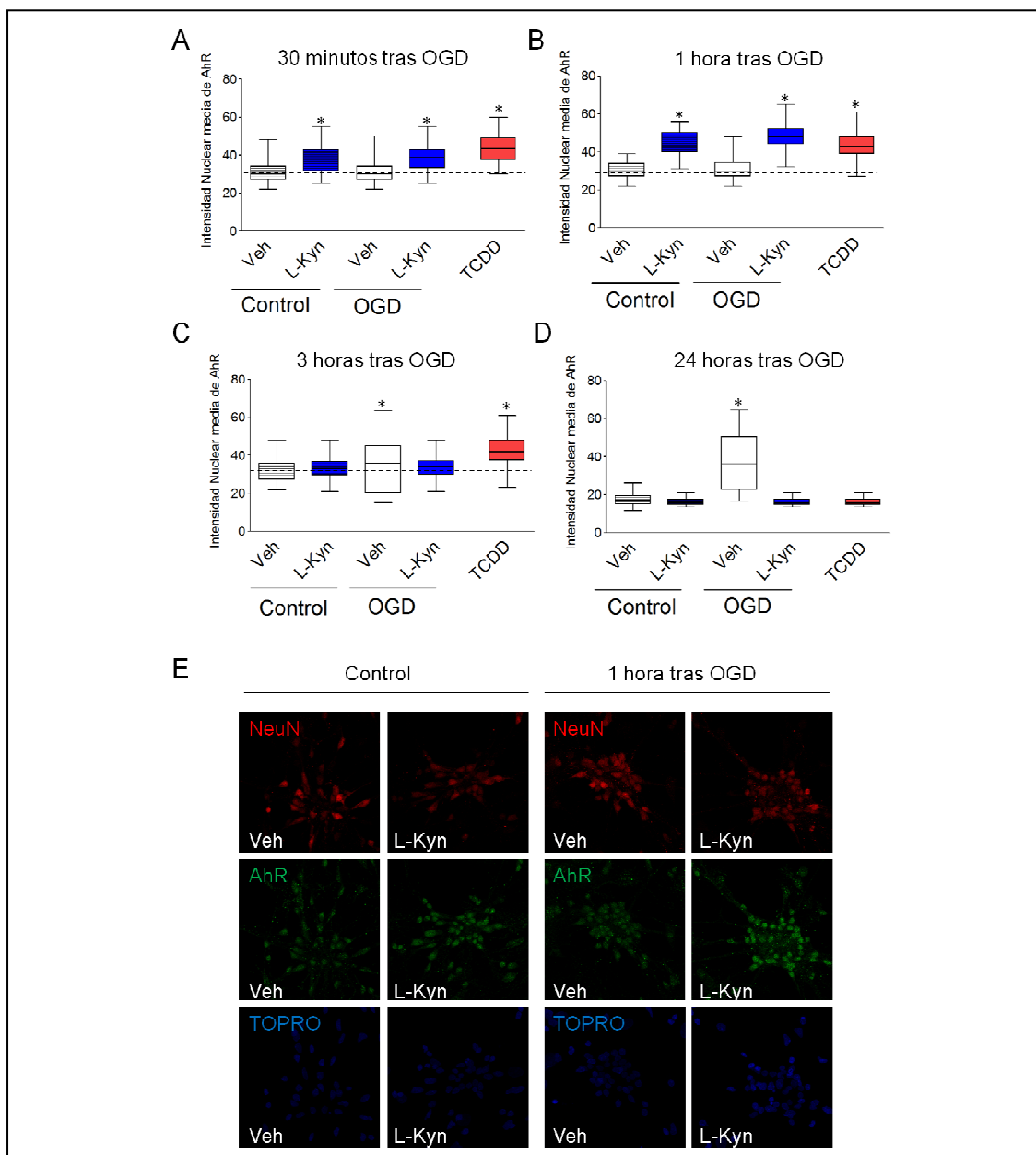


Figura 4.21. Localización celular de AhR en el compartimento nuclear de neuronas control y neuronas OGD tras el tratamiento con L-Kyn (L-kinurenina) y TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina). (A-D) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia para AhR determinada mediante la delimitación manual de los núcleos TOPRO⁺. La distribución de los datos se representa mediante plots de caja, en donde se muestra la mediana junto con los percentiles del 25 y el 75 %. Las barras señalan la posición de los centiles de 90 y 10. La cuantificación fue realizada a 30 minutos (A), 1 hora (B), 3 horas (C) y 24 horas (D) tras la OGD. La cuantificación se realizó en al menos 200 núcleos de 6 experimentos distintos (* $p < 0.05$ vs neuronas control). (E y F) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de AhR (verde), en combinación con el marcador neuronal NeuN (rojo) y el marcador nuclear TOPRO (azul), de neuronas control tratadas con vehículo y L-Kyn (panel izquierdo) y neuronas OGD tratadas con vehículo y L-Kyn (panel derecho) 1 hora tras la OGD.

De manera similar a lo observado para el agonista TCDD, tanto las neuronas control como las neuronas OGD tratadas con L-kinurenina incrementaron los niveles de AhR en el compartimento nuclear tras el tratamiento con el metabolito del triptófano. Este incremento en la traslocación de AhR se detectó a los 30 minutos de la reperfusión, alcanzando su pico a 1 hora, y retornando a los niveles basales a las 3 horas (**Figura 4.21, A-C y panel E**). Al comparar esta respuesta de activación de AhR con la obtenida en las neuronas tratadas con vehículo, observamos que el tratamiento con L-Kyn adelantaba el patrón temporal de traslocación de AhR al núcleo en respuesta a la OGD, cuyo pico de activación se situaba entre las 3 y las 24 horas post-reperfusión.

Para confirmar los resultados obtenidos mediante los estudios de inmunofluorescencia, se analizaron de las fracciones citoplasmáticas y nucleares de neuronas tratadas con el agonista L-Kyn (**Figura 4.22**).

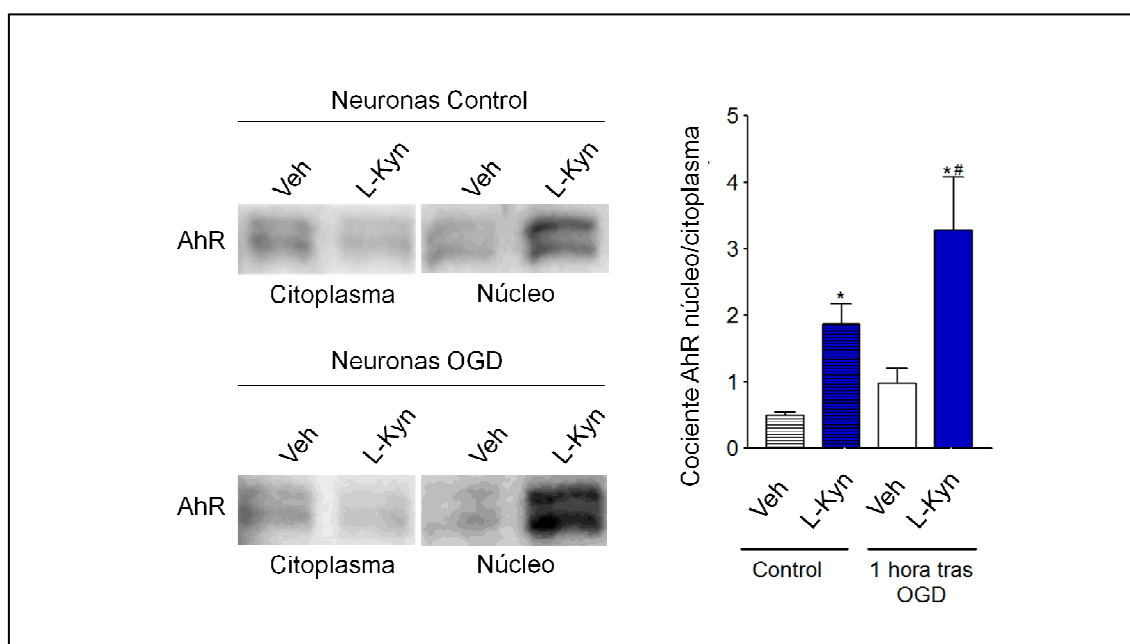


Figura 4.22. Localización subcelular de AhR tras el tratamiento con L-Kyn. Detección de los niveles nucleares y citoplasmáticos de AhR en neuronas control y OGD tratadas con vehículo o L-Kyn (L-kinurenina) 1h tras la reperfusión. En la gráfica de la izquierda, se muestra la cuantificación de AhR en las fracciones nuclear y citosólica representado como el cociente de AhR núcleo/citoplasma (* $p < 0.05$ vs. neuronas control veh; # $p < 0.05$ vs. neuronas OGD veh; $n = 6$ por grupo). Los paneles de la derecha muestran imágenes representativas de los resultados obtenidos en las neuronas control (panel superior) y en las neuronas OGD (panel inferior). Los niveles de Sp1 fueron evaluados para determinar la pureza de las fracciones nucleares.

Tal y como se observó en los estudios previos de inmunofluorescencia, el tratamiento con L-Kyn indujo un incremento en la traslocación de AhR 1 hora tras la reperfusión en neuronas control y neuronas OGD (**Figura 4.22**), siendo este incremento significativamente mayor en las neuronas sometidas a la OGD.

Además, al evaluar la expresión de Cyp1a1 y Cyp1b1 en neuronas control y neuronas OGD tras el tratamiento con L-Kyn 5 horas post-reperfusión (**Figura 4.23, panel A y B respectivamente**), observamos cómo L-Kyn incrementó significativamente la expresión de ambos genes diana de AhR y, al igual que ocurría con la traslocación de AhR, este incremento fue significativamente mayor en las neuronas OGD en comparación con las neuronas control.

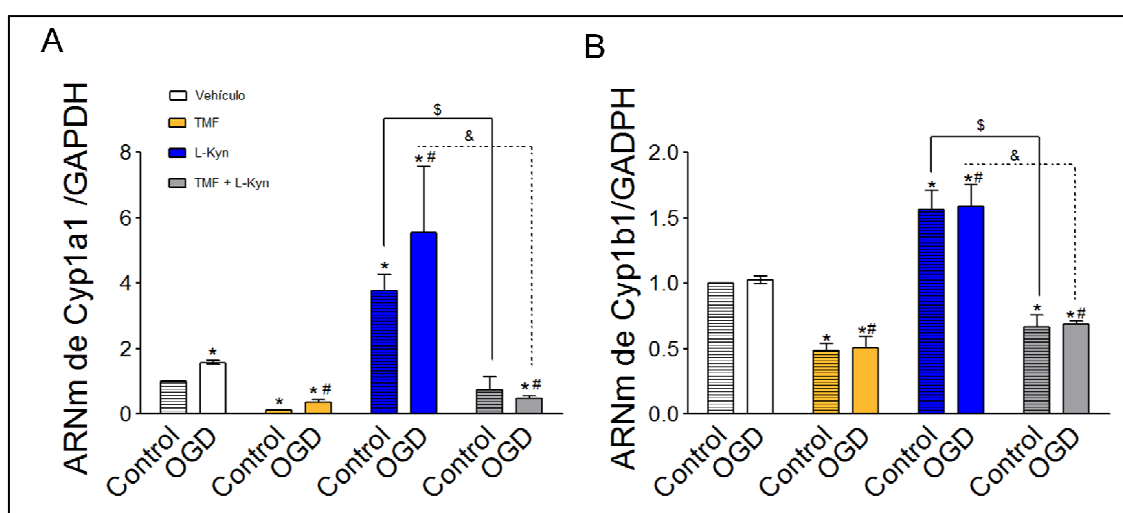


Figura 4.23. Expresión de Cyp1a1 y Cyp1b1 en neuronas control y OGD tras el tratamiento con L-Kyn. Detección mediante RT-PCR del ARNm de los genes diana de AhR Cyp1a1 y Cyp1b1 en neuronas control y OGD, 1h tras la reperfusión tratadas con vehículo, TMF (6,2',4'-trimetoxiflavona), L-Kyn (L-kinurenina) y TMF + L-Kyn. **(A)** Expresión normalizada de Cyp1a1 en neuronas control y neuronas OGD tras los diferentes tratamientos. **(B)** Expresión normalizada de Cyp1b1 en neuronas control y neuronas OGD tras los diferentes tratamientos. El gen GADPH fue utilizada como control de carga (n=6 por grupo. *p<0.05 vs. neuronas control veh; #p<0.05 vs. neuronas OGD veh; \$p<0.05 vs. neuronas control L-Kyn; & p<0.05 vs. neuronas OGD L-Kyn).

El incremento en la expresión de Cyp1a1 y Cyp1b1 mediado por L-Kyn parece dependiente de AhR, ya que el tratamiento combinado de L-Kyn con el antagonista específico de AhR TMF inhibió la inducción de ambos genes. El

tratamiento con el antagonista también bloqueó la inducción dependiente de la isquemia de Cyp1a1 (**Figura 4.23, panel A**) y disminuyó significativamente los niveles de Cyp1b1, el cual no se induce como consecuencia de la isquemia al tiempo estudiado (**Figura 4.23, panel B**).

Ya que a través del tratamiento con L-Kyn éramos capaces de modular la activación de AhR, decidimos determinar si la inhibición de la enzima TDO, cuya expresión habíamos visto aumentada, ejercería el efecto contrario en la activación de AhR. Para ello, llevamos a cabo la inhibición farmacológica de la enzima TDO en cultivos de neuronas mediante el tratamiento con el inhibidor selectivo 680C91 (**Figura 4.24**).

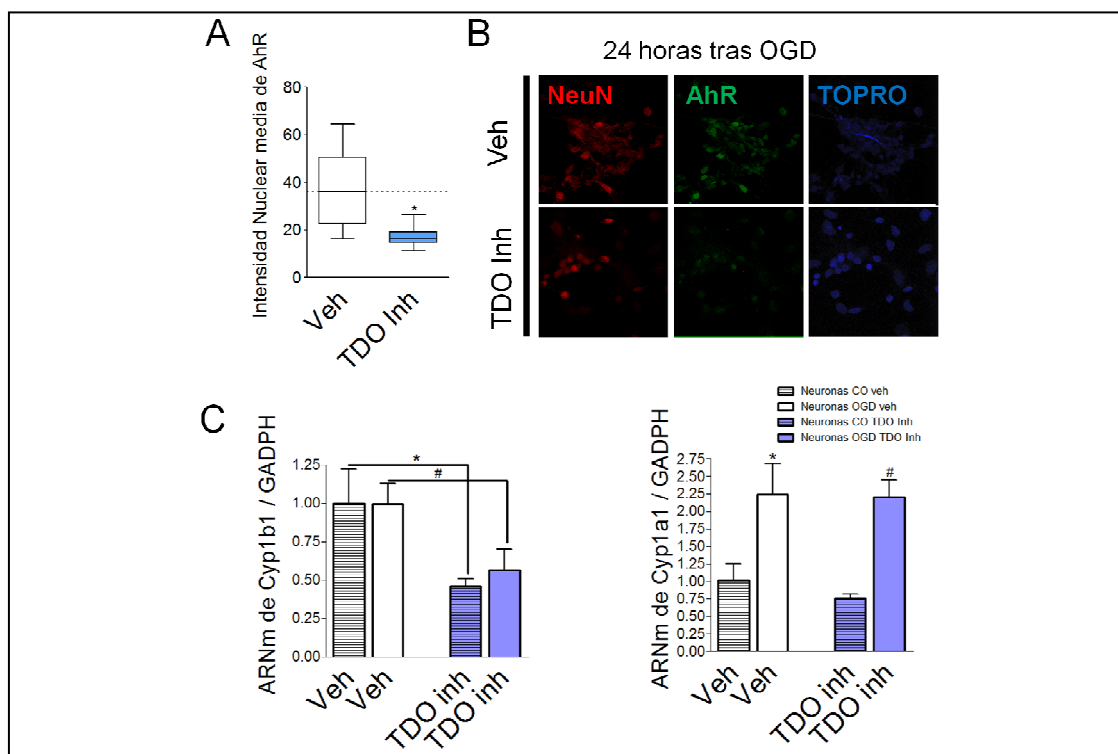


Figura 4.24. Efecto de la inhibición de la enzima TDO en neuronas corticales sobre la traslocación de AhR. (A) Niveles nucleares de AhR en neuronas OGD tratadas con vehículo o el inhibidor selectivo de la enzima TDO (triptófano-2,3-dioxigenasa) 680C91, 5 horas tras la reperusión. La distribución de los datos se representa mediante plots de caja, en donde se muestra la mediana y los percentiles del 25 y el 75 %. Las barras muestran los centiles de 90 y 10. (* $p < 0.05$ vs neuronas + vehículo; La cuantificación se realizó en 200 núcleos de 3 experimentos distintos). **(B)** Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de AhR (verde), con el marcador neuronal NeuN (rojo) y el marcador nuclear TOPRO (azul), de neuronas OGD tratadas con vehículo o el inhibidor de la enzima TDO. **(C)** RT-PCR del ARNm de Cyp1a1 y Cyp1b1 en neuronas control y OGD tratadas con vehículo y el inhibidor de la enzima TDO. La GADPH fue utilizada como control de carga (n=6 por grupo. * $p < 0.05$ vs. neuronas control veh; # $p < 0.05$ vs. neuronas OGD veh).

El análisis por inmunofluorescencia de AhR en el compartimento nuclear 5 horas tras OGD (**Figura 4.24, panel A y panel B**) mostró cómo la inhibición endógena de la síntesis de L-kinurenina mediante la inhibición farmacológica de la enzima TDO (**Figura 24, A y B**) disminuyó la traslocación al núcleo de AhR en comparación con lo observado para las neuronas tratadas con vehículo.

Además, decidimos determinar si la inhibición de la enzima TDO era capaz de reducir la expresión de dos de los genes diana de AhR, Cyp1b1 y Cyp1a1. Como se muestra en la **Figura 24C**, la inhibición de la enzima TDO disminuyó significativamente la expresión de Cyp1b1 tanto en las neuronas control como en las neuronas expuestas a OGD (**Figura 24C, panel de la izquierda**). Sin embargo, no fuimos capaces de detectar una reducción significativa de los niveles de Cyp1a1 tras la inhibición de la enzima TDO (**Figura 24C, panel de la derecha**).

Finalmente, quisimos determinar si la modulación *in vivo* de los niveles de L-kinurenina regulaba la traslocación de AhR tal y como habíamos observado *in vitro*. Para ello, analizamos las fracciones citosólicas y nucleares de extractos corticales de ratones sometidos a pMCAO, 4 y 24 horas tras la oclusión de la ACM, que fueron tratados 10 minutos tras la oclusión con vehículo, L-Kyn (10 mg/Kg) y el inhibidor de la enzima selectivo de la enzima TDO 680C91 (10 mg/Kg). Como se observa en la **Figura 4.25**, la isquemia incrementó de manera significativa la traslocación de AhR al núcleo a las 4 y a las 24 horas de la oclusión. El tratamiento con el inhibidor de la enzima TDO inhibió la traslocación de AhR al núcleo a las 4 y 24 horas tras pMCAO (**Figura 4.25, A y B**). Sin embargo, en contra de lo esperado, no detectamos un incremento de la traslocación de AhR tras la administración *in vivo* de L-kinurenina ni a las 4 ni a las 24 horas tras la isquemia (**Figura 4.25, A y B**), observando en comparación

con los niveles de los animales pMCAO vehículo una reducción de los mismos en ambos tiempos.

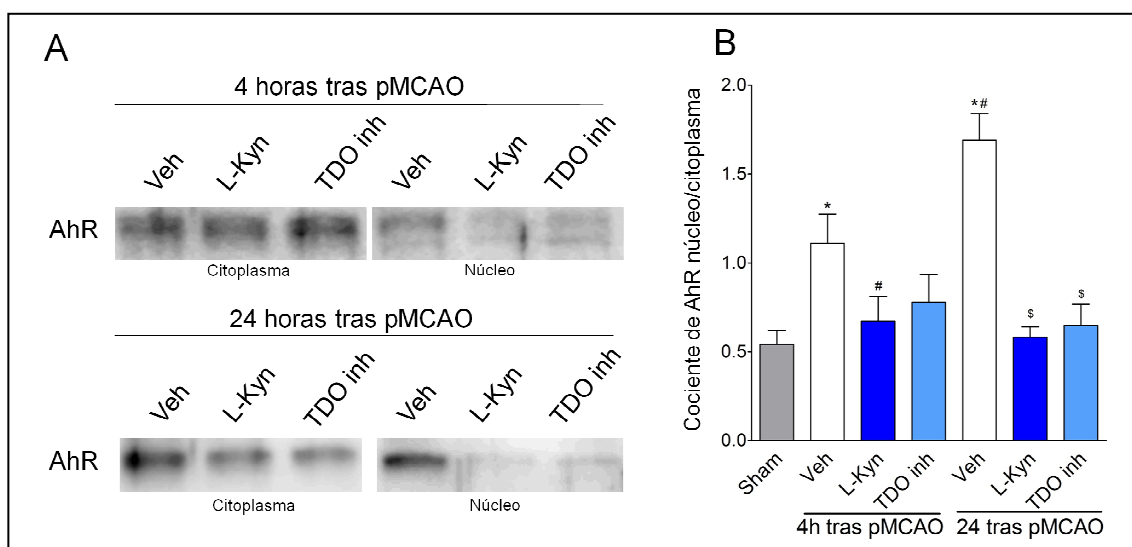


Figura 4.25. Efecto del tratamiento con L-Kyn y el inhibidor de la enzima TDO sobre la traslocación de AhR al núcleo tras isquemia experimental en ratón. (A) Imagen representativa de la detección de AhR en las fracciones nucleares y citosólicas tras el tratamiento *in vivo* con vehículo, L-Kyn (L-kinurena) y el inhibidor de la enzima TDO (triptófano-2,3-dioxigenasa) 680C91, 4 y 24 horas tras la oclusión de la ACM. (B) Cuantificación densitométrica de AhR en las fracciones nucleares y citosólicas obtenidas a partir de tejido de la zona peri-infarto + *core* a 4 y 24 horas tras la oclusión de la arteria cerebral media en ratones tratados con vehículo, L-Kyn (10mg/Kg) y el inhibidor de la enzima TDO (10 mg/Kg). La cuantificación del ratio núcleo/citoplasma de AhR muestra la proporción relativa de AhR en el compartimento nuclear. Los niveles de Sp1 se utilizaron para estimar la pureza de las fracciones nucleares (n=5 por grupo; *p<0.05 vs. Sham; #p<0.05 vs. pMCAO vehículo 4h; \$p<0.05 vs. pMCAO vehículo 24h).

4.2.4 Efecto de L-Kyn sobre la viabilidad de cultivos neuronales tras OGD o exposición a NMDA: Dependencia de AhR

Ya que el tratamiento *in vitro* con L-kinurena es capaz de modular la traslocación de AhR al núcleo así como su activación, quisimos determinar si el tratamiento con L-Kyn en cultivos neuronales tras OGD presentaba algún efecto sobre la viabilidad de las neuronas y si este efecto se revertía mediante el bloqueo selectivo del receptor AhR a través del uso de su antagonista TMF.

Como se observa en la **Figura 4.26 (paneles A y B)**, el tratamiento de las neuronas con L-Kyn incrementó la muerte neuronal en comparación con las

neuronas tratadas con vehículo. Este incremento se determinó a las 24 horas de la reperfusión mediante la cuantificación de las células positivas para yoduro de propidio por citometría de flujo (**Figura 4.26, panel A**) así como mediante el % de liberación de LDH (**Figura 4.26, panel B**).

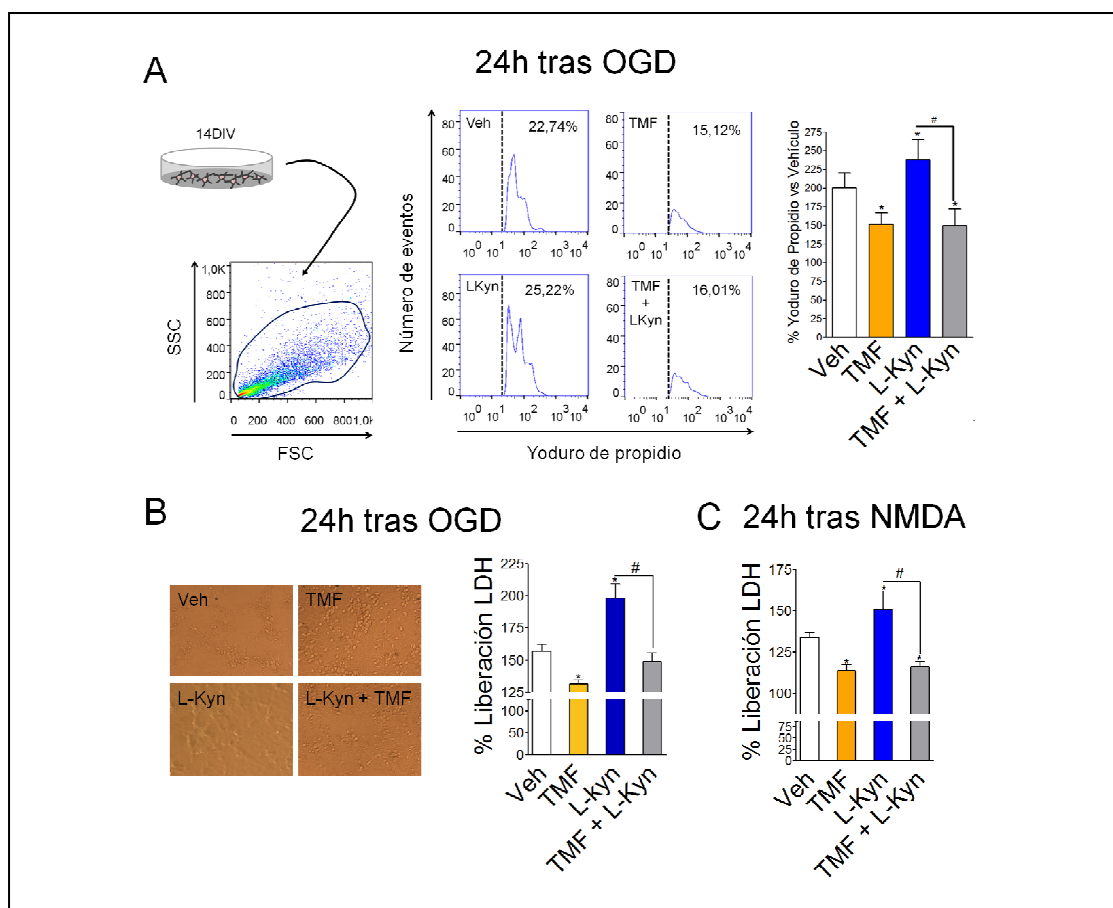


Figura 4.26. Efecto del ligando de AhR L-kinurenina tras OGD o tratamiento con NMDA en cultivos de neuronas corticales de rata. (A) Análisis mediante citometría de flujo del % de incorporación de IP (yoduro de propidio) con respecto a las neuronas control, en neuronas pre-tratadas con vehículo, TMF (6,2',4'-trimetoxiflavona), L-Kyn (L-kinurenina) y TMF + L-Kyn 24 horas antes de la inducción de la OGD. La incorporación de IP se estimó 24 horas tras la OGD. En el panel de la izquierda se muestra la región neuronal en base a FSC (*Forward scatter*) y SSC (*Side scatter*). El panel central muestra histogramas representativos del marcaje de yoduro de propidio para cada uno de los tratamientos. El % mostrado en los histogramas indica el % de células que habían incorporado IP. **(B)** El panel de la izquierda muestra imágenes representativas de las neuronas tras la OGD tratadas con vehículo, TMF, L-Kyn y TMF + L-Kyn. En el panel de la derecha se muestra el % de liberación de LDH 24 horas tras la OGD con respecto a las neuronas control tras cada tratamiento. **(C)** % de liberación de LDH con respecto a las neuronas control, en neuronas pre-tratadas con vehículo, TMF, L-Kyn y TMF + L-Kyn 24 horas antes del tratamiento con NMDA (100 μ M) + glicina (10 μ M). El % de LDH se calculó 24 horas tras el tratamiento con NMDA. (* $p < 0.05$ vs. neuronas vehículo; # $p < 0.05$ vs. neuronas L-Kyn; $n = 24$ réplicas por condición de 3 experimentos diferentes).

La administración conjunta de L-Kyn con el antagonista de AhR TMF bloqueó el incremento en la muerte neuronal ocasionado por L-Kyn (**Figura 4.26, panel A y B**). Para confirmar el efecto deletéreo de L-Kyn, utilizamos un segundo modelo de excitotoxicidad mediante la exposición de los cultivos neuronales a una concentración tóxica de NMDA (**Figura 4.26C**). El pre-tratamiento de las neuronas con L-Kyn previa a la exposición a NMDA incrementó la liberación de LDH de manera similar a lo observado tras la OGD. De igual forma, el pre-tratamiento conjunto de L-Kyn con el antagonista de AhR TMF bloqueó el incremento en la muerte neuronal producido por L-Kyn. Estos resultados sugieren que la administración de L-Kyn en cultivos neuronales media efectos deletéreos en modelos de excitotoxicidad, y ya que este efecto es bloqueado por el antagonista de AhR TMF, los efectos se producen, al menos en parte, a través de la activación de AhR.

4.2.5 Efecto de L-Kyn sobre el volumen de infarto tras pMCAO en ratón: Dependencia de AhR

Con el fin de validar los resultados obtenidos *in vitro*, llevamos a cabo la administración de vehículo, TMF, L-Kyn (10 mg/Kg) y el tratamiento combinado L-Kyn + TMF en animales sometidos a pMCAO y evaluamos el volumen de infarto 48 horas tras la oclusión (**Figura 4.27**). Tal y como habíamos mostrado previamente, la administración intraperitoneal de TMF presentó un efecto neuroprotector. Aunque a diferencia de lo observado *in vitro*, la administración *in vivo* de L-Kyn no produjo un incremento en el volumen de infarto en comparación con el grupo de animales tratados con vehículo, la administración de L-Kyn en combinación con TMF bloqueó parte de los efectos neuroprotectores del antagonista, observándose una menor reducción del volumen de infarto en comparación con el grupo de animales tratados con TMF.

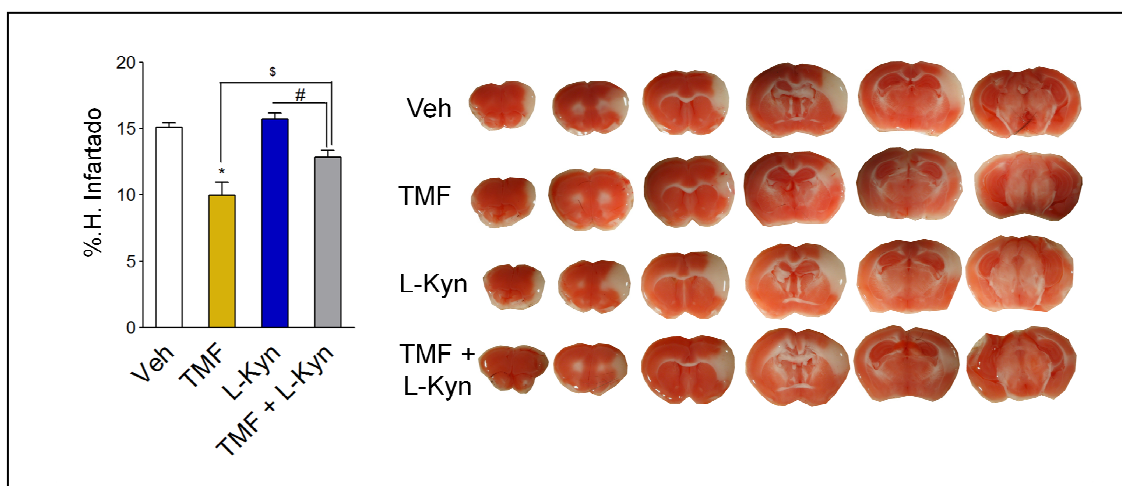


Figura 4.27. Efecto de la administración *in vivo* del agonista de AhR L-Kyn en el volumen de infarto. Cuantificación del volumen de infarto de animales tratados con vehículo, TMF (6,2',4'-trimetoxiflavona) (5 mg/Kg), L-Kyn (L-kinureenina) (10mg/Kg) y TMF + L-Kyn 48 horas tras pMCAO mediante tinción con TTC. Los datos se representan % de hemisferio infartado. En el panel de la izquierda se muestran imágenes representativas del volumen de infarto de cada uno de los grupos (* $p < 0.05$ vs. pMCAO vehículo; $n = 7$ por grupo).

Por tanto, estos resultados apoyan los obtenidos *in vitro*, y sugieren que al menos parte del daño ocasionado por la activación de AhR tras la isquemia cerebral se produce a través de la vía L-kinureenina–AhR, ya que la administración exógena de L-Kyn interfiere con los efectos neuroprotectores del antagonista de AhR.

4.2.6 Efecto de la inhibición de la enzima TDO sobre el volumen de infarto tras pMCAO en ratón

Finalmente, decidimos determinar el efecto *in vivo* de la inhibición de la enzima TDO en el volumen de infarto tras pMCAO. Inicialmente, llevamos a cabo un protocolo de administración que consistió en la administración i.p. del inhibidor de la enzima TDO (10 mg/Kg) 10 minutos tras la oclusión. La elección de esta dosis se realizó en base a la baja solubilidad del compuesto (Pilotte et al., 2012). Como se observa en la **Figura 4.28 (paneles A-B y paneles D-E)**, la administración en dosis única del inhibidor de la enzima TDO no produjo diferencias en el volumen de infarto en comparación con el grupo pMCAO

vehículo, determinado a las 24 horas por resonancia magnética (Figura 4.28 panel A y D) o a las 48h mediante TTC (Figura 4.28, panel B y E).

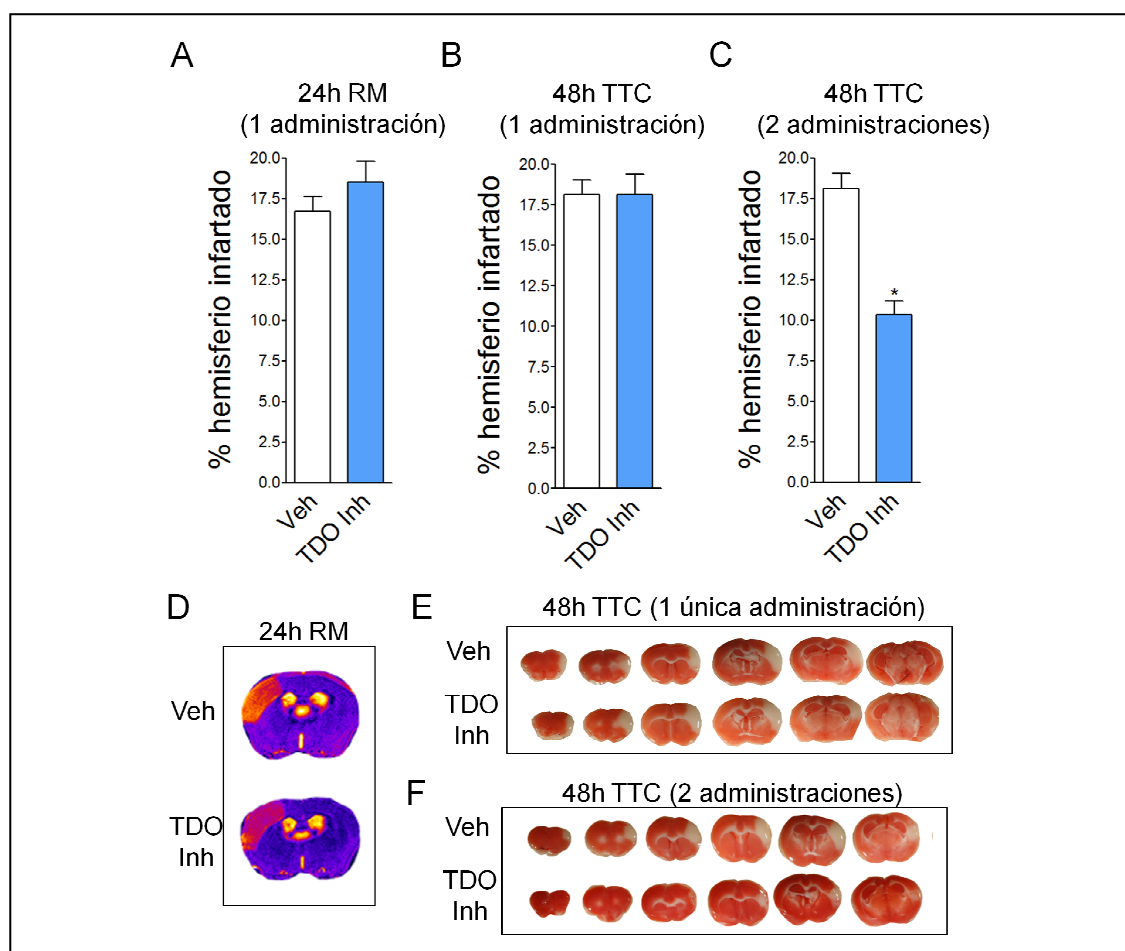


Figura 4.28. Efecto del inhibidor de la enzima TDO en el volumen de infarto tras pMCAO en ratón. Efecto del inhibidor de la enzima TDO (triptófano-2,3-dioxigenasa) (10 mg/Kg) 680C91 en el volumen de infarto, administrado en dosis única 10 minutos después de la pMCAO (A y B), o en dos dosis, 10 minutos y 7 horas tras pMCAO (C). El volumen de infarto se determinó a las 24h mediante resonancia magnética (RM) (A) y a las 48h mediante TTC (B y C). (D) Imágenes representativas del volumen de infarto a las 24h en el protocolo de dosis única (E) Imágenes representativas del volumen de infarto a las 48h en el protocolo de dosis única. (F) Imágenes representativas del volumen de infarto a las 48h en el protocolo de dos administraciones (n=7 por grupo; *p<0.05 vs. pMCAO vehículo).

Los resultados observados en relación a la concentración de triptófano y L-kinurenina en el cerebro (Figura 4.18), así como la inducción de la enzima TDO 5 horas tras la oclusión, nos llevaron a pensar que tras la isquemia existe de manera transitoria una inhibición del metabolismo del triptófano por la ruta de las kinureninas que se restaura a tiempos posteriores. En base a esto, decidimos

determinar el efecto de una segunda administración del inhibidor de la enzima TDO a las 7 horas tras la isquemia. Como se observa en la **Figura 4.28 (panel C y F)**, el inhibidor de la enzima TDO, administrado a los 10 minutos y, posteriormente, a las 7 horas tras la pMCAO, redujo significativamente el volumen de infarto en comparación con el grupo de animales pMCAO vehículo, determinado a las 48h mediante TTC.

Estos resultados sugieren, que la inhibición endógena de la síntesis de L-kinurenina es neuroprotectora en un modelo experimental de isquemia cerebral.

4.3 MECANISMOS IMPLICADOS EN LOS EFECTOS DE LA MODULACIÓN DE LA VÍA DE L-KYN-AHR EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

4.3.1 Modulación farmacológica de AhR en la isquemia cerebral: Acciones en el receptor NMDA

4.3.1.1 Efecto de la modulación farmacológica de AhR sobre la $[Ca^{2+}]$ intracelular tras la exposición de cultivos neuronales a NMDA

Como hemos mostrado previamente, el pretratamiento de las neuronas con el antagonista TMF o el agonista de AhR L-Kyn inhibe o promueve, respectivamente, la excitotoxicidad tras OGD o NMDA de manera AhR-dependiente. Estos resultados sugieren que la modulación de AhR produce cambios celulares a largo plazo que van a determinar la respuesta de las neuronas ante estímulos citotóxicos como el NMDA o la OGD. Como comentamos en la Introducción, uno de los mayores determinantes del destino de la neurona tras la isquemia, así como tras la exposición a NMDA, es la entrada masiva de Ca^{2+} a través de los receptores NMDA postsinápticos (Simon et al., 1984). Por este motivo, analizamos si la modulación de la señal de AhR,

mediante el tratamiento con TMF, L-Kyn o TMF + L-Kyn, producía cambios en la $[Ca^{2+}]$ intracelular tras la exposición a una concentración tóxica de NMDA, utilizando la sonda fluorescente Fluo-4AM.

Como se muestra en la **Figura 4.29**, la aplicación de NMDA, a una concentración 100 μ M sobre las neuronas, indujo un incremento en la $[Ca^{2+}]$ intracelular representado como un incremento en la fluorescencia para la sonda Fluo-4AM, tanto por el pico de máxima respuesta (**Figura 4.29, A**) como por el área estimada bajo la curva (**Figura 4.29, B**). El pre-tratamiento de las neuronas con el antagonista TMF bloqueó significativamente la elevación de la $[Ca^{2+}]$ inducida por el NMDA, mientras que el agonista de AhR L-Kyn produjo un incremento en la $[Ca^{2+}]$ intracelular en comparación con las neuronas pretratadas con vehículo. Este incremento de $[Ca^{2+}]$ intracelular no se observó tras el cotratamiento previo con TMF + L-Kyn.

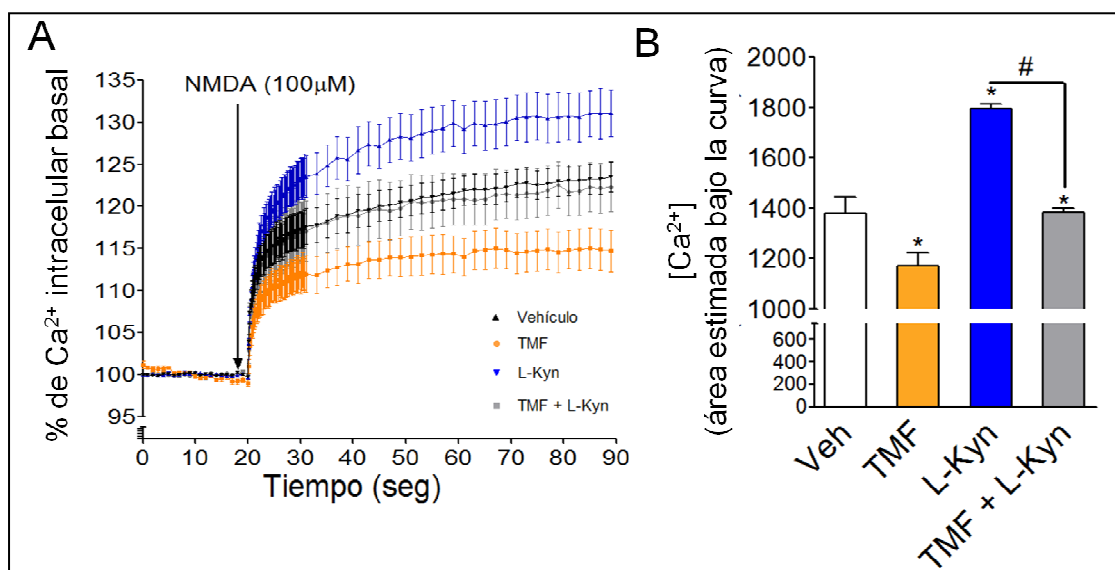


Figura 4.29. Efecto de la modulación farmacológica de AhR en la concentración de Ca^{2+} intracelular. (A) Cuantificación del incremento en el Ca^{2+} intracelular tras la aplicación de una concentración tóxica de NMDA en neuronas pre-tratadas durante 24 horas con vehículo, TMF (6,2',4'-trimetoxiflavona), L-Kyn (L-kinurenina) y TMF + L-Kyn. El incremento en Ca^{2+} intracelular se representa como el % de incremento con respecto a la basal. (B) Cuantificación del incremento en el Ca^{2+} intracelular tras la aplicación de NMDA en neuronas pre-tratadas durante 24 horas con vehículo, TMF, L-Kyn y TMF + L-Kyn. La gráfica representa el área estimada bajo la curva en cada uno de los tratamientos como resultado de la exposición al NMDA (100 μ M) (* $p < 0.05$ vs. Neuronas Vehículo; # $p < 0.05$ vs. Neuronas L-Kyn; $n = 24$ réplicas por condición; 3 experimentos diferentes).

La elevación de Ca^{2+} en el interior celular tras la exposición a NMDA es debida fundamentalmente a su entrada través de los receptores NMDA. Sin embargo, para confirmar que no es debida a otras rutas y que no es dependiente de la viabilidad celular del cultivo, llevamos a cabo el tratamiento conjunto de NMDA y de KCl 30 mM en combinación con el antagonista competitivo de los receptores NMDA D-AP5. El KCl es un agente despolarizante que produce la entrada de Ca^{2+} principalmente a través de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (Sattler et al., 1998).

Como se observa en la **Figura 4.30**, la aplicación del antagonista NMDA D-AP5 bloqueó de manera selectiva la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]$ promovida por NMDA, pero no la promovida por el KCl.

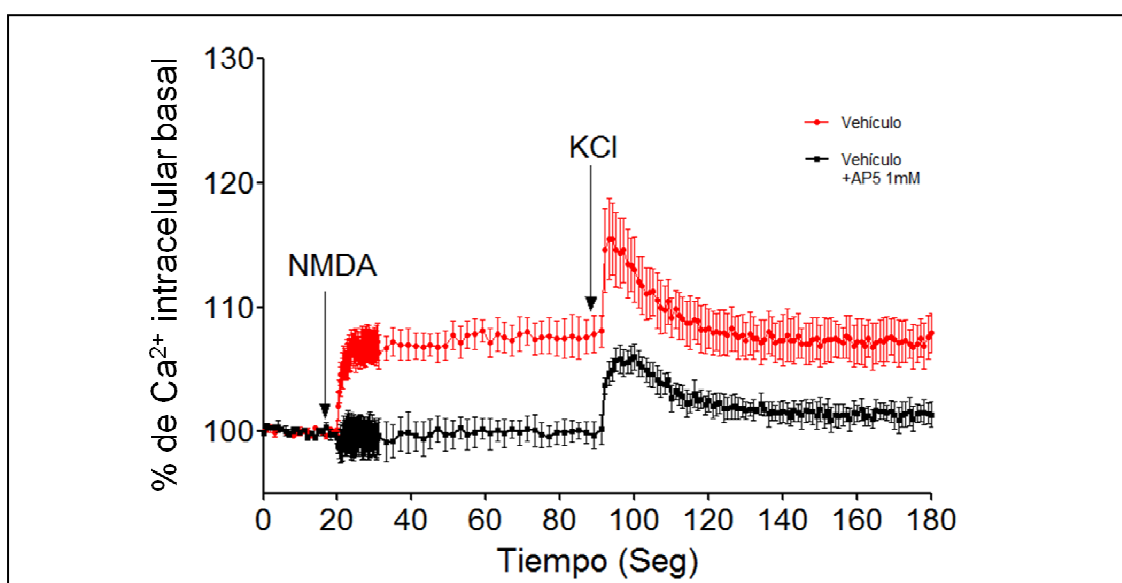


Figura 4.30. Efecto del antagonista competitivo de los receptores NMDA, D-AP5, en la entrada de Ca^{2+} promovida por la exposición a NMDA o KCl. Mientras que en las neuronas tratadas con vehículo tanto la exposición a NMDA ($100\mu\text{M}$) como la exposición a KCl (30mM), produjo un incremento en el Ca^{2+} intracelular, representado como % de inducción con respecto a la basal, en las neuronas pre-tratadas con el antagonista competitivo de los receptores NMDA D-AP5 (1mM), no incrementó la concentración de Ca^{2+} tras la exposición a NMDA pero si al tratarse con KCl, lo que es indicativo de que la respuesta observada tras el tratamiento con NMDA es específica de los receptores NMDA. Las flechas indican el momento en el que se produjo la exposición de las neuronas al NMDA y al KCl (n=6 réplicas por condición; 2 experimentos diferentes).

Además, puesto que ninguno de los tratamientos afectó a la elevación de Ca^{2+} promovida por la exposición a altas concentraciones de KCl (**Figura 4.31**), podemos inferir que la respuesta en la $[\text{Ca}^{2+}]$ observada tras la modulación de la señal de AhR por los diferentes tratamientos es dependiente de los receptores NMDA.

Por tanto, estos resultados sugieren que la activación de AhR inducida por la isquemia regula el funcionamiento de los receptores NMDA.

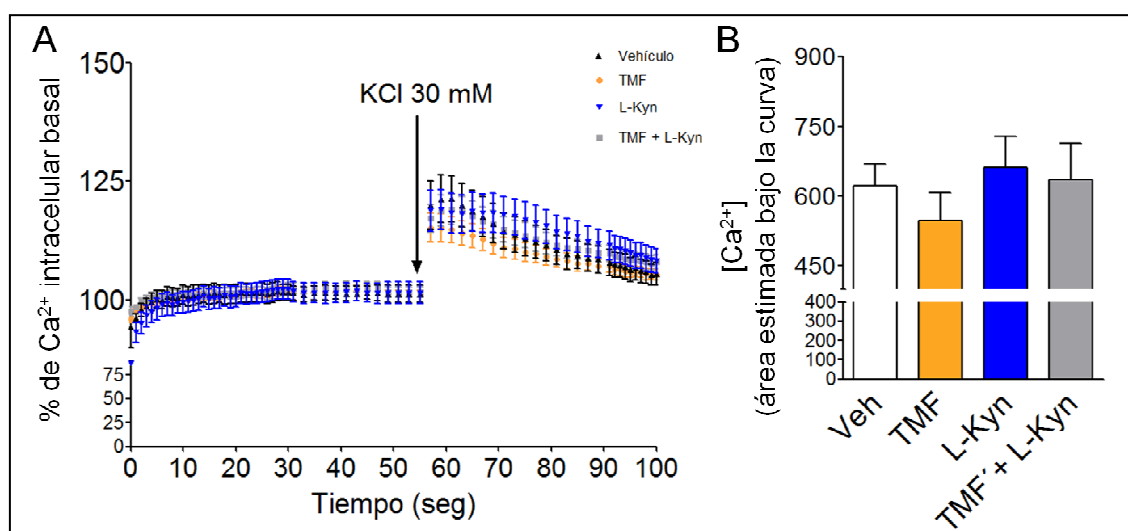


Figura 4.31. Efecto de la modulación farmacológica de AhR en la concentración de Ca^{2+} intracelular tras la exposición a KCl. (A) y (B) Neuronas pre-tratadas durante 24 horas con vehículo, TMF (6,2',4'-trimetoxiflavona), L-Kyn (L-kinurenina) y L-Kyn + TMF se sometieron a la exposición con KCl y se evaluó la elevación de Ca^{2+} mediada por el KCl, representado como el % de inducción con respecto a la basal (A) y el área estimada bajo la curva (B). (* $p < 0.05$ vs. neuronas vehículo; # $p < 0.05$ vs. neuronas L-Kyn; $n = 24$ réplicas por condición; 3 experimentos diferentes).

4.3.1.2 Efecto de la modulación farmacológica de AhR sobre la regulación de las subunidades de los receptores NMDA tras isquemia cerebral *in vitro* e *in vivo*

Los estudios previos llevados a cabo por Lin y colaboradores (Lin et al., 2009; 2008) mostraban como AhR es capaz de modular la excitotoxicidad y la entrada de Ca^{2+} en neuronas corticales a través de la regulación diferencial de las distintas subunidades de los receptores NMDA.

Dado que la expresión relativa de las subunidades de los receptores NMDA es un factor que contribuye a la entrada de Ca^{2+} (Léveillé et al., 2008), quisimos evaluar si la modulación de la ruta de AhR tras OGD alteraba los niveles totales de los receptores NMDA. Para ello, inicialmente llevamos a cabo el análisis mediante RT-PCR de la expresión de las subunidades NR1, NR2A y NR2B en neuronas corticales, 5 horas tras OGD, que habían sido tratadas con vehículo, TMF, L-Kyn o TMF + L-Kyn (**Figura 4.32**). En contra de lo esperado, y según lo previamente publicado (Lin et al., 2009; 2008), no encontramos diferencias significativas en los niveles de ARNm de ninguno de estos genes. De manera similar, el análisis *in vivo* de la expresión de las subunidades de los receptores NMDA en animales tratados con TMF o en heterocigotos para AhR, tras la oclusión de la ACM, tampoco mostró diferencias significativas (datos no mostrados en este estudio). Estos resultados nos indican que, en nuestro modelo, la activación y/o inhibición del receptor AhR no regula las subunidades de los receptores NMDA a nivel transcripcional.

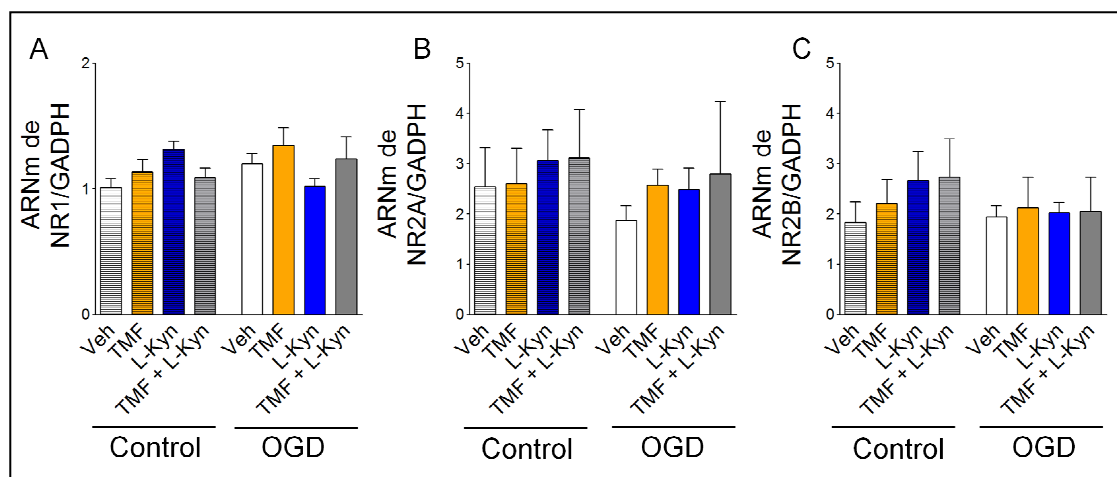


Figura 4.32. Expresión del ARNm de las subunidades de los receptores en neuronas corticales sometidas a OGD. Expresión 5 horas tras OGD de las subunidades de los receptores NMDA, NR1 (A), NR2A (B) y NR2B (C) en neuronas corticales tratadas con vehículo, TMF (6,2',4'-trimetoxiflavona), L-Kyn (L-kinurenina) y L-Kyn + TMF medida por RT-PCR. Los valores de GADPH fueron utilizados para normalizar la expresión de los distintos genes (n=6 por grupo; 2 experimentos distintos).

Seguidamente, decidimos analizar los niveles proteicos totales de las distintas subunidades, *in vivo* e *in vitro*. Para ello, las neuronas se trataron con vehículo,

TMF, L-Kyn y TMF + L-Kyn y, 24 horas tras la reperusión, se realizó el análisis de las distintas subunidades mediante western blot (**Figura 4.33**).

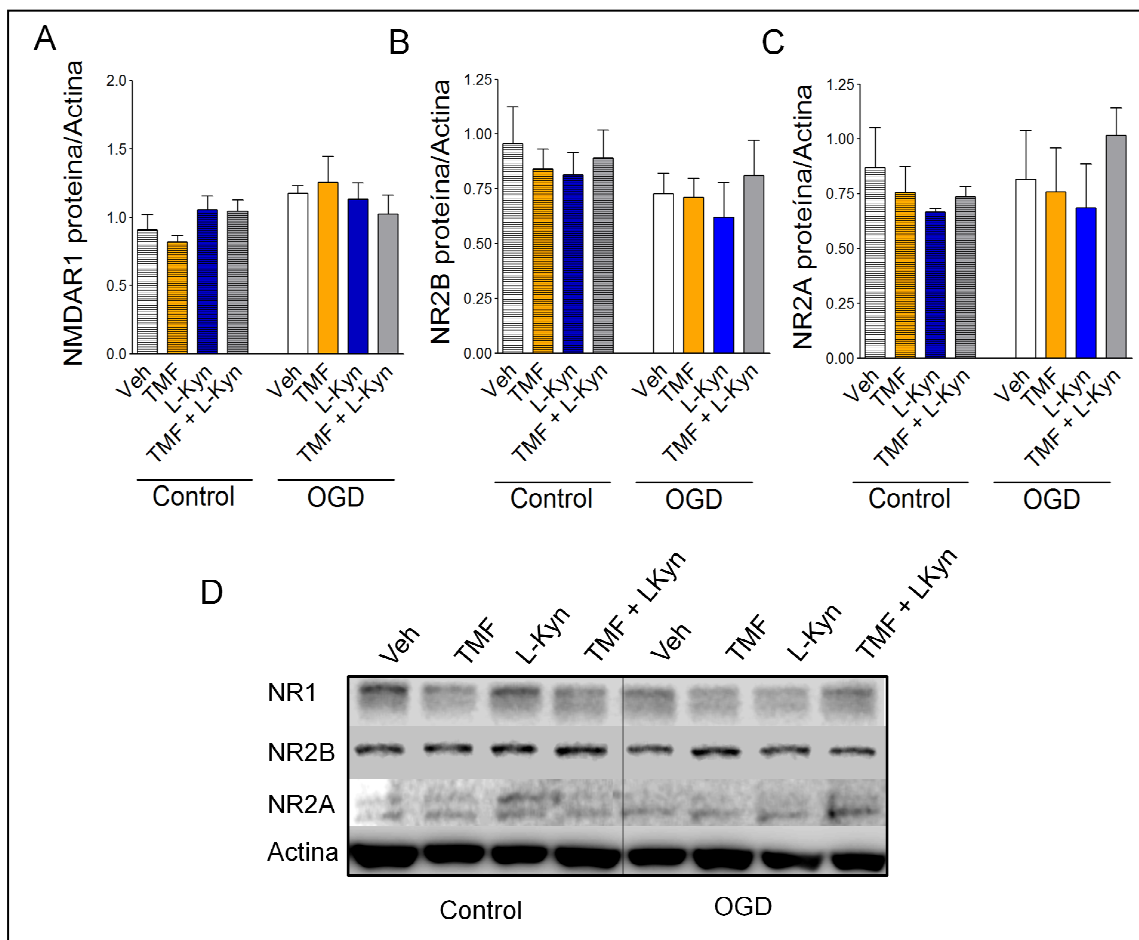


Figura 4.33. Expresión proteica de las diferentes subunidades de los receptores NMDA en neuronas corticales tras OGD. Cuantificación mediante western blot de la expresión de las subunidades NR1 (**A**), NR2B (**B**) y NR2A (**C**), en neuronas corticales tratadas con vehículo, TMF (6,2',4'-trimetoxiflavona), L-Kyn (L-kinurenina) y TMF + L-Kyn 24 horas tras la OGD (n=8 por grupo; 3 experimentos distintos). (**D**) Imagen representativa de los niveles de expresión de las distintas subunidades tras los diferentes tratamientos.

Tal y como se muestra en la **Figura 4.33**, tampoco detectamos cambios en los niveles totales de las distintas subunidades, ni a consecuencia de los tratamientos, ni a consecuencia de la isquemia. En base a estos últimos resultados y a los obtenidos a nivel transcripcional, podemos concluir que, en nuestro modelo *in vitro*, la neuroprotección y la excitotoxicidad dependiente de la inhibición y activación de AhR, respectivamente, así como las diferencias observadas en la $[Ca^{2+}]$ intracelular, no son debidas a variaciones en la

expresión total de las diferentes subunidades que constituyen los receptores NMDA, como previamente habían publicado Lin y colaboradores (Lin et al., 2009; 2008).

Finalmente, el análisis de la expresión proteica total de las subunidades NR1, NR2A y NR2B también se realizó *in vivo*, utilizando extractos corticales de las regiones peri-infarto y *core* de animales sham y pMCAO tratados con vehículo o el antagonista de AhR TMF, 24 horas tras la oclusión (**Figura 4.34**). Mientras que a nivel de la región de peri-infarto no observamos diferencias entre ninguno de los grupos analizados (datos no mostrados en este estudio), en la región del *core* se observó una disminución de los niveles de NR2A y NR2B en el grupo de animales pMCAO tratados con vehículo en comparación con los animales sham (**Figura 4.34, paneles izquierdos C y E; D y F**). La administración de TMF tras la oclusión evitó la reducción de los niveles de ambas subunidades. En relación a la subunidad NR1, no detectamos cambios ni por la isquemia ni por el tratamiento (**Figura 4.34, A-B**). La disminución observada en NR2A y NR2B tras la isquemia cerebral está de acuerdo con resultados previos de diversos grupos (Guttmann et al., 2001; Guttmann et al., 2002; Yuen et al., 2008) que indican que dichas subunidades sufren un proceso de fragmentación proteolítica en su extremo C-terminal dependiente de la entrada de Ca^{2+} y la activación de la enzima calpaína. Para confirmar este punto, llevamos a cabo la cuantificación de la forma fragmentada de ambas subunidades mediante anticuerpos específicos para NR2A y NR2B que reconocen la región C-terminal. La forma fragmentada de ambas subunidades presenta un peso aproximado de 115 KDa. Como era de esperar, en los animales pMCAO tratados con vehículo, la reducción de las subunidades NR2A y NR2B (forma no fragmentada de 180KDa), se acompañó por un incremento de la forma fragmentada (**Figura 4.34, paneles derechos C y E; D y F**). Por el contrario, el tratamiento con el antagonista de AhR TMF disminuyó significativamente la fragmentación proteolítica de ambas subunidades.

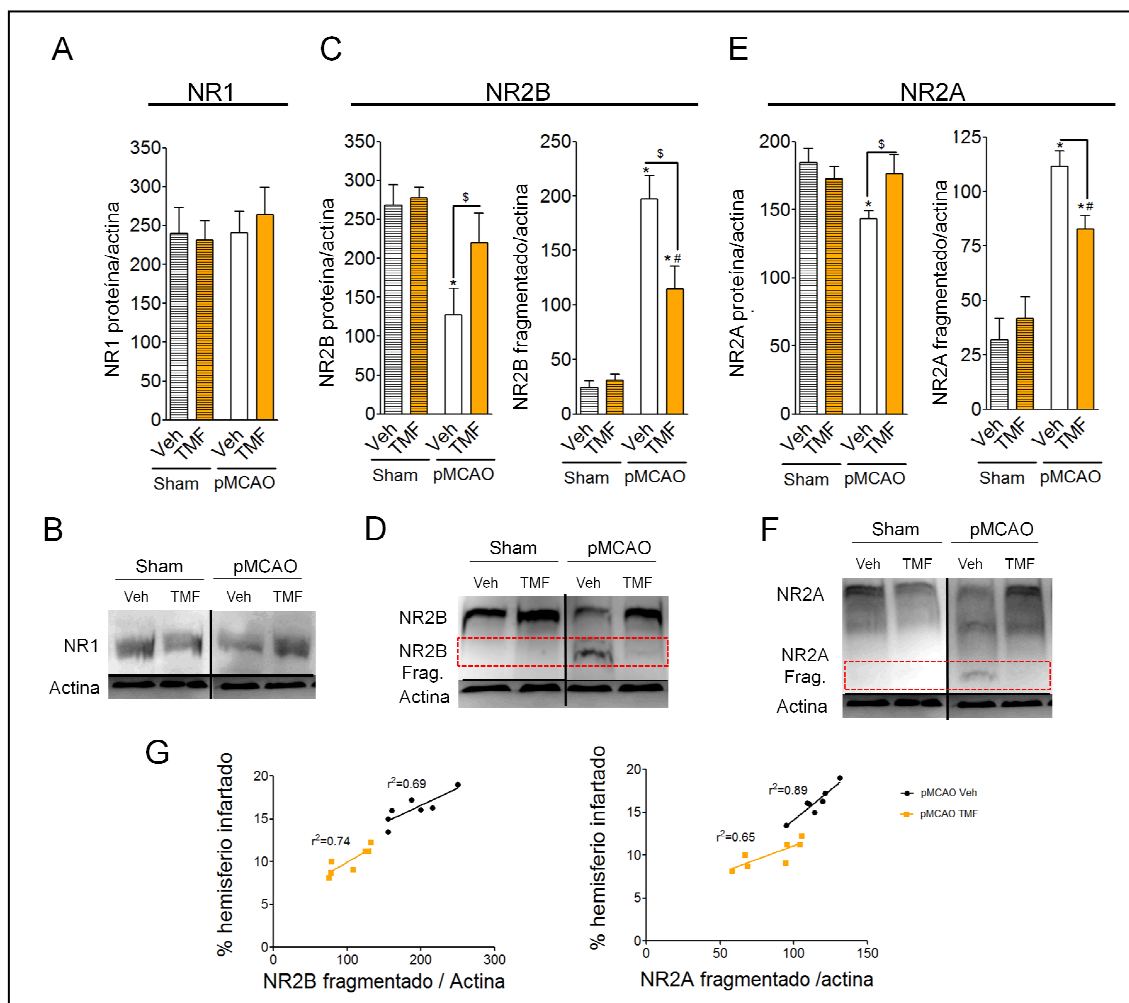


Figura 4.34. Expresión proteica total de las subunidades de los receptores NMDA tras isquemia cerebral *in vivo*. (A) Cuantificación densitométrica en la región del *core* de los niveles de la subunidad NR1 en animales tratados con vehículo o TMF (6,2',4'-trimetoxiflavona) 24h tras la oclusión. (B) Cuantificación densitométrica en la región del *core* de los niveles de la subunidad NR2B en animales tratados con vehículo o TMF 24h tras la oclusión. El panel de la izquierda muestra la cuantificación de la forma no fragmentada de la subunidad NR2B (~180 KDa), mientras que el panel de la derecha muestra la cuantificación de la forma fragmentada (~110KDa). (C) Cuantificación densitométrica en la región del *core* de los niveles de la subunidad NR2A en animales tratados con vehículo o TMF 24h tras la oclusión. El panel de la izquierda muestra la cuantificación de la forma no fragmentada de la subunidad NR2A (~180 KDa), mientras que el panel de la derecha muestra la cuantificación de la forma fragmentada (~110KDa). (D) Imágenes representativas de los resultados obtenidos para la subunidad NR1. (E) Imágenes representativas de los resultados obtenidos para la subunidad NR2B. El recuadro en rojo delimita la forma fragmentada de la subunidad. (F) Imágenes representativas de los resultados obtenidos para la subunidad NR2A. El recuadro en rojo delimita la forma fragmentada de la subunidad. (G) Correlación del volumen de infarto con la fragmentación de la subunidad NR2B (panel de la izquierda) y NR2A (panel de la izquierda) (n=6-7 por grupo; *p<0.05 vs. sham vehículo; #p<0.05 vs. sham TMF; \$p<0.05 vs. pMCAO vehículo).

Por último, quisimos determinar si el proceso de fragmentación proteolítica era dependiente del volumen del infarto. Para ello, realizamos una correlación de los niveles de la forma fragmentada de las subunidades NR2A y NR2B con el volumen de infarto de cada uno de los animales en los grupos pMCAO tratados con vehículo o TMF. Como se observa en la **Figura 4.34G**, tanto en los animales tratados con vehículo como en los animales tratados con TMF, la fragmentación se correlacionó de manera directa con el volumen de infarto.

Seguidamente, quisimos determinar si AhR modulaba el funcionamiento de los receptores NMDA a través de una expresión diferencial de las distintas subunidades a nivel de la membrana (**Figura 4.35**).

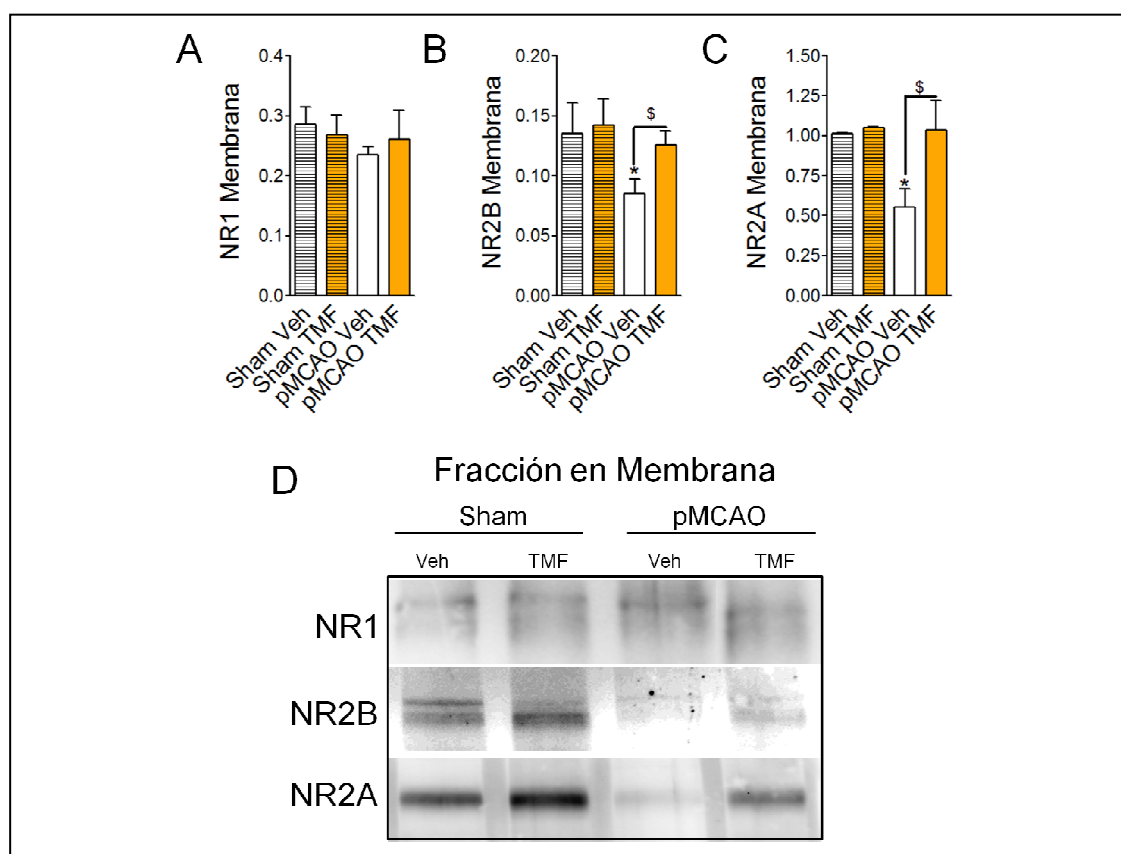


Figura 4.35. Efecto del antagonista de AhR TMF sobre los niveles de las subunidades del receptor NMDA en membrana *in vivo*. Cuantificación densitométrica en animales sham y pMCAO, tratados con vehículo y TMF (6,2',4'-trimetoxiflavona), de los niveles en membrana de las subunidades NR1 (**A**), NR2B (**B**) y NR2A (**C**) 24 horas tras la oclusión de la ACM. (**D**) Panel representativo con los resultados obtenidos para las diferentes subunidades en las fracciones de membrana (n=5-6 por grupo; *p<0.05 vs. sham vehículo; \$p<0.05 vs. pMCAO vehículo).

El análisis de la fracción cruda de membrana en el modelo *in vivo* mostró cómo tras la isquemia, los niveles en membrana de las subunidades NR2A y NR2B disminuyen significativamente en comparación con el grupo de animales sham (**Figura 4.35, A-B y panel C**), no observándose cambios para la subunidad NR1 (**Figura 4.35, A y panel C**). Además, el tratamiento con TMF tras la oclusión de la ACM evitó la disminución de la expresión en membrana de ambas subunidades (**Figura 4.35, A y panel C**).

Para confirmar estos resultados, los cultivos de neuronas corticales de rata se trataron con vehículo, TMF, L-Kyn y L-Kyn + TMF, y 24 horas después se procedió al aislamiento de las proteínas de membrana. Como se observa en la **Figura 4.36 (paneles A-C)**, el tratamiento de los cultivos neuronales con TMF, incrementó la expresión en membrana de la subunidad NR2B (**Figura 4.36, A y C**) en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Aunque el agonista de AhR L-Kyn no produjo diferencias significativas en los niveles de membrana de esta subunidad NR2B, el tratamiento conjunto de TMF + L-Kyn mostró una tendencia similar a la observada para TMF. En el caso de la subunidad NR1 (**Figura 4.36, A y B**), el tratamiento de las neuronas con L-Kyn incrementó significativamente su expresión en membrana, no observándose cambios para esta subunidad con el resto de tratamientos. Con respecto a la subunidad NR2A, no se realizó la cuantificación debido a los bajos niveles, por lo que no pudimos confirmar el incremento observado *in vivo* tras la inhibición de AhR.

Como comentamos en la Introducción, la localización de los receptores NMDA en la membrana neuronal, bien sea una localización sináptica o extrasináptica, se relaciona con un funcionamiento diferencial de los receptores. Mientras que los receptores localizados en la sinapsis activan de manera preferencial rutas implicadas en la supervivencia neuronal, los receptores NMDA localizados en los sitios extrasinápticos activan rutas intracelulares que conducen a la muerte de la neurona (Hardingham y Bading, 2010).

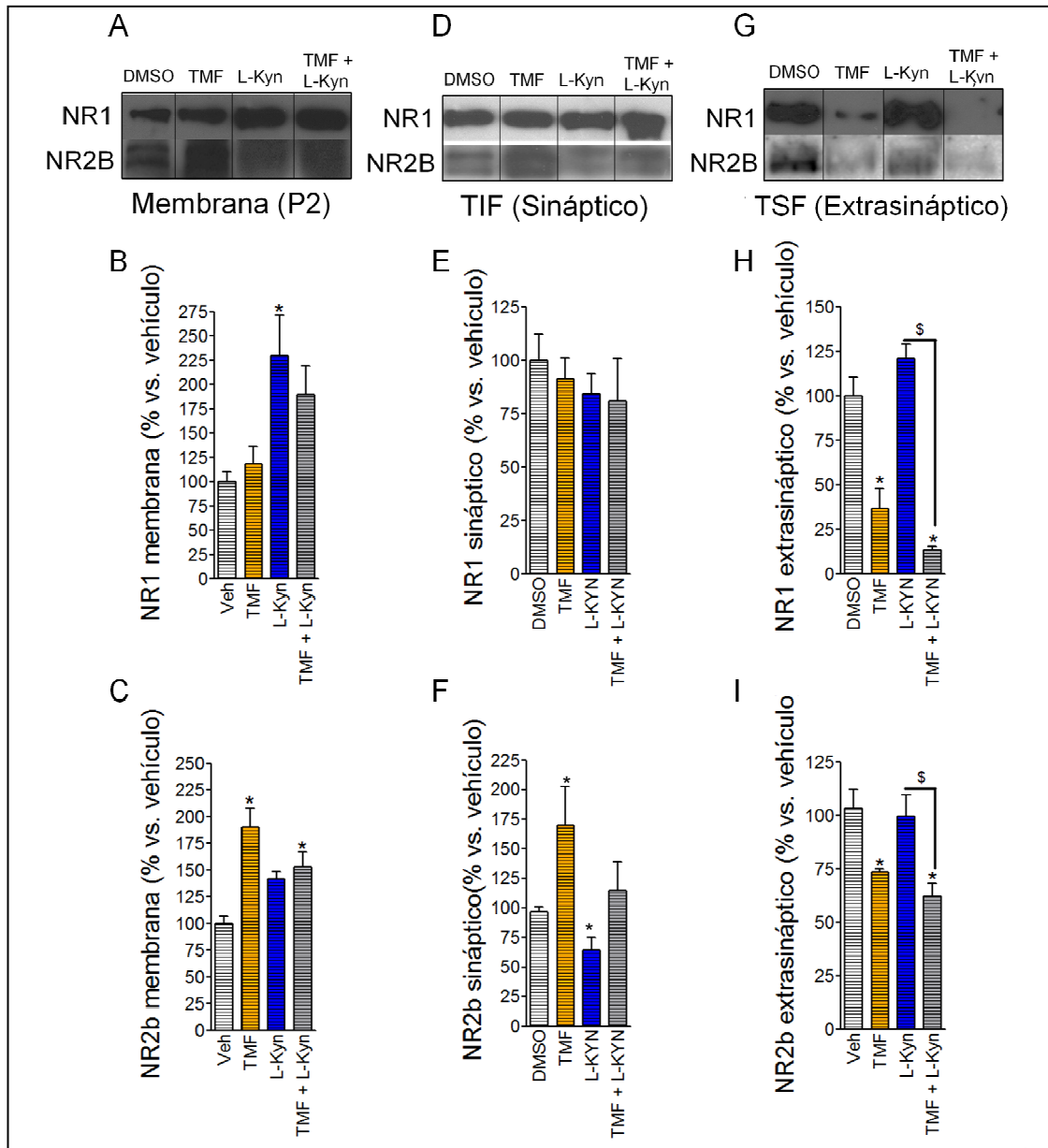


Figura 4.36. Efecto de TMF y/o L-Kyn sobre los niveles de las subunidades del receptor NMDA en la membrana de neuronas corticales. (A) Panel representativo con los resultados obtenidos para las subunidades NR1 y NR2B en las fracciones totales en membrana (Fracción P2) en neuronas corticales tratadas con vehículo, TMF (6,2',4'-trimetoxiflavona), L-Kyn (L-kinurenina) y TMF + L-Kyn. (B-D) Cuantificación densitométrica de los niveles de las subunidades NR1 (B) y NR2B (C) 24 horas tras el tratamiento. (D) Panel representativo con los resultados obtenidos para las subunidades NR1 y NR2B en la fracción tritón insoluble (TIF), que se corresponde con las membranas sinápticas en neuronas corticales tratadas con vehículo, TMF, L-Kyn y TMF + L-Kyn. (E-F) Cuantificación densitométrica de los niveles de las subunidades NR1 (E) y NR2B (F) en la fracción TIF 24 horas tras el tratamiento. (G) Panel representativo con los resultados obtenidos para las subunidades NR1 y NR2B en la fracción tritón soluble (TSF), que se corresponde con las membranas extrasinápticas en neuronas corticales tratadas con vehículo, TMF, L-Kyn y TMF + L-Kyn. (H-I) Cuantificación densitométrica de los niveles de las subunidades NR1 (H) y NR2B (I) en la fracción TSF 24 horas tras el tratamiento (n=5-6 por grupo; *p<0.05 vs. neuronas vehículo; \$p<0.05 vs. neuronas L-kyn). Los valores se representan como el % de inducción respecto al grupo de neuronas vehículo.

Estudios previos muestran como la isquemia induce una sobreactivación de los receptores NMDA extrasinápticos que participan en el proceso de excitotoxicidad (Tu et al., 2010). Por ello, decidimos comprobar si el mecanismo de regulación de los receptores NMDA promovido por AhR era dependiente de cambios en la localización de los receptores a nivel de la membrana neuronal.

Para ello, se procedió al fraccionamiento de las proteínas de membrana obtenidas en la fracción total P2 con el fin de obtener la fracción sináptica (TIF) y la fracción extrasináptica (TSF). Como se observa en la **Figura 4.36D-I**, las subunidades NR1 y NR2B se encontraron presentes tanto en los sitios sinápticos (**Figura 4.36, D-F**) como extrasinápticos (**Figura 4.36, G-I**). El análisis de ambas subunidades en las neuronas corticales tras los diferentes tratamientos mostró cómo el antagonista de AhR TMF reducía la localización extrasináptica de la subunidades NR1 y NR2B al mismo tiempo que incrementaba significativamente su expresión en la fracción sináptica en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. En el grupo de neuronas tratadas con el agonista de AhR L-Kyn no se observaron diferencias significativas en los niveles de NR1 y NR2B en la fracción extrasináptica en comparación con las neuronas tratadas con vehículo, sin embargo, L-Kyn redujo significativamente los niveles sinápticos de la subunidad NR2B. Estos cambios resultaron dependientes de AhR, ya que el tratamiento conjunto de TMF+L-Kyn revirtió los efectos promovidos por L-Kyn. En el caso de la subunidad NR2A, los niveles no pudieron ser cuantificados.

Por tanto, la inhibición de AhR mediante TMF disminuye los niveles de las subunidades NR1 y NR2B en los sitios extrasinápticos. Este mecanismo podría mediar en parte los efectos neuroprotectores tras la inhibición de AhR.

4.3.1.3 Efecto de la inhibición de AhR mediante su antagonista TMF sobre la fosforilación de CREB tras isquemia cerebral *in vivo* e *in vitro*

Mientras que la entrada de Ca^{2+} a través de los receptores sinápticos promueve la fosforilación mantenida de CREB, la señalización a través de los receptores extrasinápticos promueve la desfosforilación de CREB antagonizando su acción (Hardingham y Bading, 2002; Hardingham et al., 2002). Ya que la inhibición de AhR promueve una disminución de las subunidades NR1 y NR2B en los sitios extrasinápticos, determinamos si el tratamiento *in vitro* e *in vivo* con TMF alteraba los niveles de fosforilación de CREB tras la isquemia. En efecto, como se observa en la **Figura 4.37**, el tratamiento de neuronas corticales con el antagonista de AhR TMF indujo la fosforilación mantenida de CREB desde las 3 horas hasta 24 horas tras la reperusión (**Figura 4.37, A y C**).

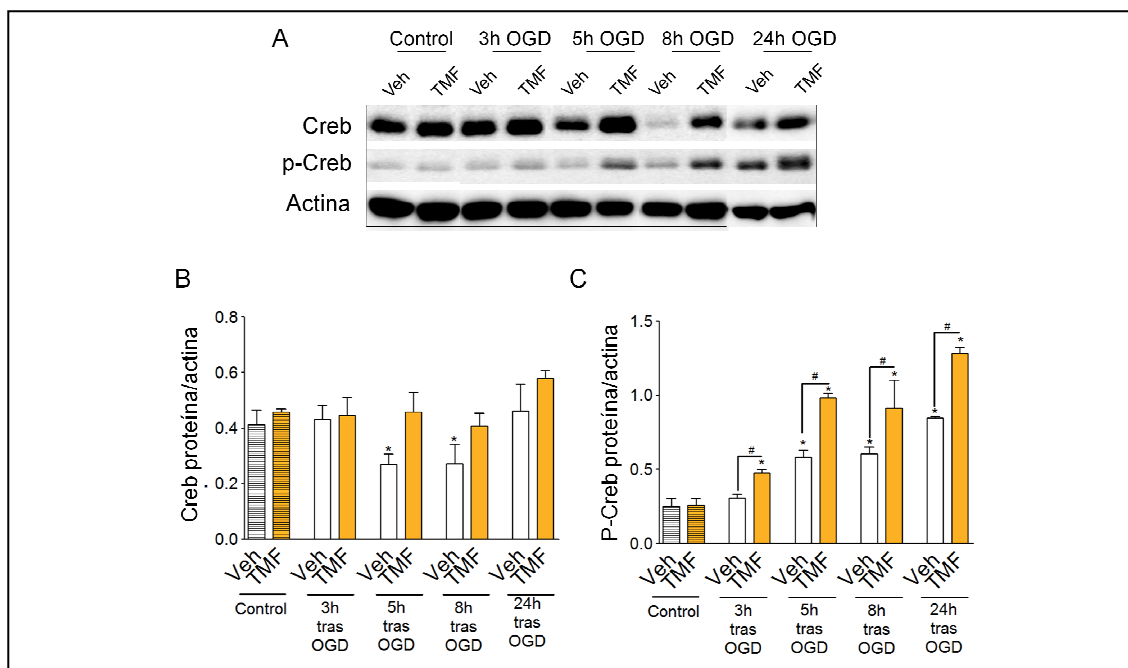


Figura 4.37. Efecto del antagonista de AhR TMF sobre la fosforilación del factor de transcripción CREB. (A) Panel representativo con los resultados obtenidos para CREB y p-CREB (CREB fosforilado) en neuronas control y OGD tratadas con vehículo y TMF (6,2',4'-trimetoxiflavona) a 3, 5, 8, y 24h tras la reperusión. (B-C) Cuantificación densitométrica de los niveles de CREB (B) y p-CREB (C). La actina fue utilizada como control de carga (n=6 por grupo; *p<0.05 vs. neuronas control vehículo; #p<0.05 vs. neuronas OGD vehículo).

Estos resultados se confirmaron mediante la administración *in vivo* del antagonista de AhR TMF. Como se muestra en la **Figura 4.38**, la administración

del antagonista de AhR TMF, 10 minutos tras la oclusión de la pMCAO, incrementó de manera significativa los niveles de CREB (**Figura 4.38, panel A y B**), así como los niveles de p-CREB (**Figura 4.38, panel A y C**) en comparación con el grupo de animales pMCAO vehículo al ser evaluados 24h tras la oclusión de la ACM.

Estos resultados confirman que la inhibición de AhR mediante TMF, *in vitro* e *in vivo*, disminuye la actividad de los receptores NMDA extrasinápticos y/o incrementa la de los sinápticos.

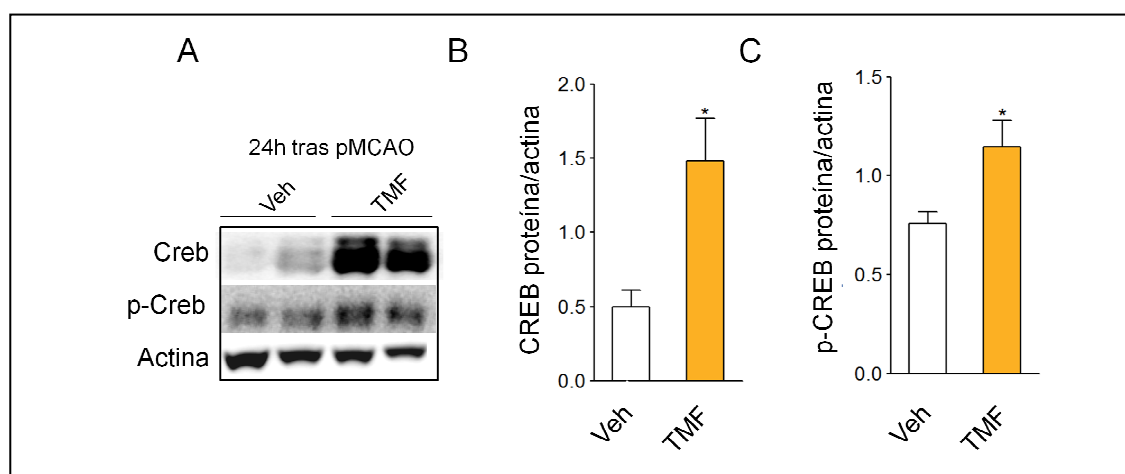


Figura 4.38. Efecto del antagonista de AhR TMF sobre la fosforilación del factor de transcripción CREB *in vivo*. (A) Panel representativo con los resultados obtenidos para CREB y p-CREB (CREB fosforilado) en animales pMCAO tratados con vehículo y TMF (6,2',4'-trimetoxiflavona), 24h tras la oclusión de la ACM. (B-C) Cuantificación densitométrica de los niveles de CREB (B) y p-CREB (C) en los diferentes grupos evaluados. La actina fue utilizada como control de carga (n=6 por grupo; *p<0.05 vs. pMCAO vehículo).

4.3.1.4 Efecto de la modulación farmacológica de AhR sobre la regulación de las MAGUKs PSD95 y Sap102 tras isquemia cerebral *in vivo* e *in vitro*

Como se comentó con anterioridad, los receptores NMDA interaccionan en su extremo C-terminal con las proteínas PSD-MAGUK. Estas proteínas participan en el tráfico de los receptores hacia la membrana, actúan a modo de anclaje y determinan su inserción y posición en la membrana, así como su estabilidad en la misma (Kim y Sheng, 2004). Estas proteínas presentan una localización preferencial, ya que, PSD95 se distribuye de manera mayoritaria, aunque no exclusivamente, en los sitios sinápticos, y Sap102 se localiza tanto en los sitios

sinápticos como extrasinápticos (Sans et al., 2003; 2005). Además, mientras que la subunidad NR2A interacciona de manera preferencial con PSD95, la subunidad NR2B lo hace con Sap102 (Sans et al., 2000), confiriendo a este último complejo una alta movilidad a lo largo de la membrana (Chen et al., 2012a).

En base a esto quisimos determinar si, los cambios observados en las subunidades de los receptores a nivel de la membrana se deben a alteraciones en las proteínas de anclaje MAGUK. Para ello, evaluamos los niveles de PSD95 y Sap102 *in vivo* (Figura 4.39).

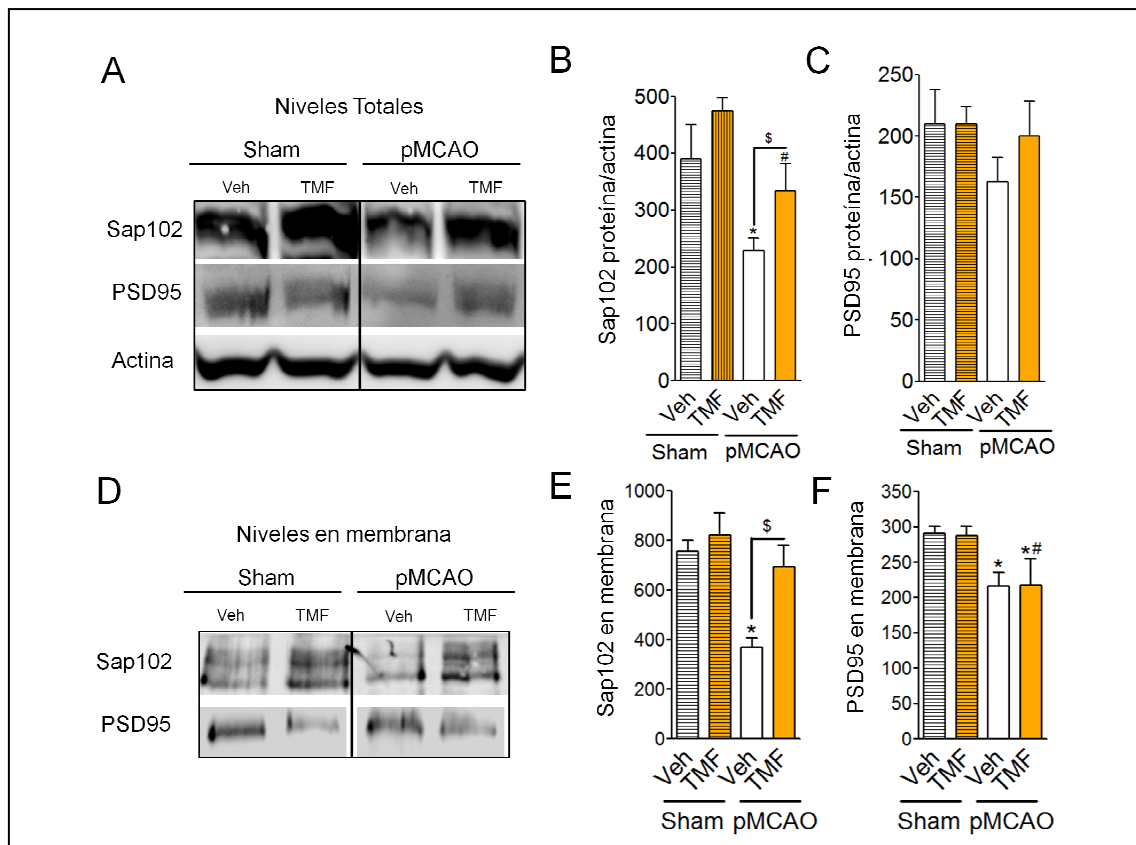


Figura 4.39. Niveles totales y en membrana de las proteínas MAGUK Sap102 y PSD95 tras pMCAO. (A) Imágenes representativas de los resultados obtenidos para Sap102 (proteína asociada a la sinapsis 102) y PSD95 (densidad postsináptica 95) en el *core* + peri-infarto de animales sham y pMCAO tratados con vehículo o TMF (6,2',4'-trimetoxiflavona), 24h tras la oclusión de la ACM. (B-C) Cuantificación de Sap102 (B) y PSD95 (C) en los diferentes grupos analizados. (D) Imágenes representativas de los resultados obtenidos para Sap102 y PSD95 en la fracción cruda de membrana de animales sham y pMCAO tratados con vehículo o TMF 24h tras la oclusión de la ACM. (E y F) Cuantificación de Sap102 (E) y PSD95 (F) en los diferentes grupos analizados. La actina se utilizó como control de carga (n= 6 por grupo; *p<0.05 vs. sham vehículo; #p<0.05 vs. sham TMF; \$p<0.05 vs. pMCAO vehículo).

Al evaluar ambas proteínas observamos cómo la isquemia produce una disminución de los niveles totales (**Figura 4.39, A-C**) y niveles de membrana (**Figura 4.39, D-F**) de la proteína Sap102 así como de la proteína PSD95. El tratamiento con TMF incrementó los niveles totales (**Figura 4.39, A-C**) y los niveles en membrana (**Figura 4.39, D-F**) de la proteína Sap102 pero no de PSD95 24h tras la oclusión de la ACM.

El incremento en los niveles en membrana de la proteína Sap102 tras la inhibición de AhR por su antagonista TMF se confirmó en las neuronas corticales (**Figura 4.40**).

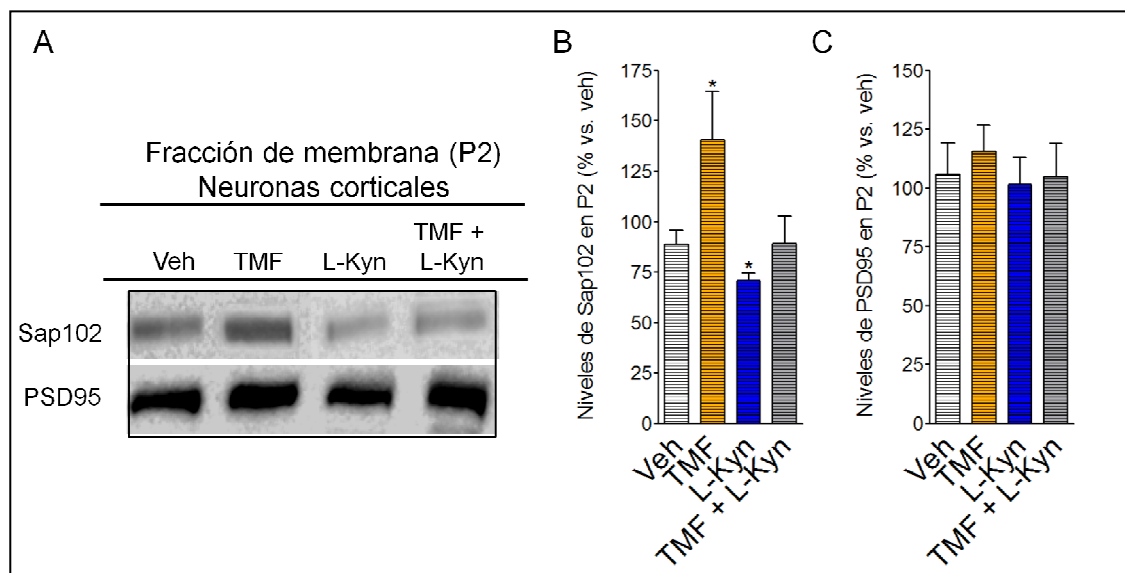


Figura 4.40. Niveles en membrana de las proteínas MAGUK Sap102 y PSD95 en neuronas corticales. (A) Imágenes representativas de los resultados obtenidos en la fracción cruda de membrana (P2) para Sap102 (proteína asociada a la sinapsis 102) y PSD95 (densidad postsináptica 95) en neuronas corticales tratadas con vehículo, TMF (6,2',4'-trimetoxiflavona), L-Kyn (L-kinurenina) y TMF + L-Kyn, 24 horas tras el tratamiento. (B-C) Cuantificación de los niveles en membrana de Sap102 (B) y PSD95 (C) (n= 6 por grupo; *p<0.05 vs. neuronas vehículo).

Mientras que el tratamiento con el antagonista para AhR TMF incrementó de manera significativa los niveles de Sap102 en membrana, el tratamiento con el agonista de AhR L-Kyn produjo una ligera reducción de los mismos en comparación con las neuronas corticales tratadas con vehículo (**Figura 4.40, A y**

B). En el caso de la proteína PSD95 no se observaron cambios entre los diferentes tratamientos (**Figura 4.40, B y C**).

Por tanto, los cambios a nivel de los receptores NMDA observados tras la activación y/o inhibición de AhR podrían ser mediados por cambios en las proteínas MAGUK asociados a los mismos.

A continuación, llevamos a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación de Sap102 en animales sham y pMCAO tratados con vehículo y TMF, para determinar si, tras la isquemia, se producían cambios en la interacción de los receptores NMDA con la proteína Sap102, y si el tratamiento con TMF era capaz de revertir ese efecto. Como se muestra en la **Figura 4.41**, tras la isquemia, la interacción de Sap102 con la subunidad NR2B (**Figura 4.41, A y B**) así como con la proteína PSD95 (**Figura 4.41, A y C**) disminuyó significativamente en comparación con lo observado para el grupo de animales sham vehículo.

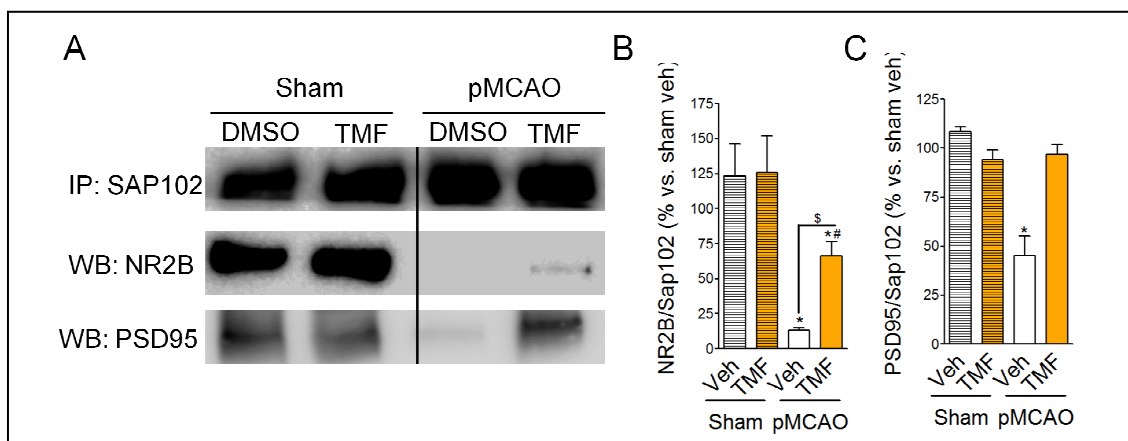


Figura 4.41. Análisis de la co-inmunoprecipitación de Sap102 tras pMCAO. (A) Homogenados corticales de ratones sham y pMCAO tratados con vehículo y TMF (6,2',4'-trimetoxiflavona), se co-inmunoprecipitaron (IP) con un anticuerpo específico para Sap102 (proteína asociada a la sinapsis 102). El análisis por western blot (WB) se realizó para NR2B, NR2A, PSD95 (densidad postsináptica 95) y la propia Sap102. En el panel se muestran las imágenes representativas de los complejos inmunoprecipitados para cada una de las condiciones analizadas. (B-C) Cuantificación del western blot para NR2B (B) y PSD95 (C) realizado sobre los complejos inmunoprecipitados para Sap102. Los datos se normalizaron por el valor de Sap102 precipitado. Los resultados se representan como el % vs. grupo de animales sham vehículo (n=3 por grupo; *p<0.05 sham vehículo; #p<0.05 sham TMF; \$p<0.05 pMCAO vehículo).

Cuando los animales se trataron con TMF, se recuperó de manera parcial la interacción de Sap102 con la subunidad NR2B (**Figura 4.41, A y B**) y de manera total la interacción con PSD95 (**Figura 4.41, A y C**). En ninguno de los grupos detectamos la interacción de Sap102 con la subunidad NR2A (datos no mostrados en este estudio).

Estos resultados sugieren que AhR participa en la organización y anclaje de los receptores en la membrana neuronal, a través de un mecanismo que implica la interacción con las proteínas MAGUKs Sap102 y PSD95.

4.3.1.5 Efecto del antagonista de AhR TMF sobre la interacción de AhR con Sap102 tras isquemia cerebral en ratón

Los resultados mostrados hasta ahora sugieren que AhR modula el funcionamiento de los receptores NMDA a través de cambios en las interacciones de los mismos con las proteínas de anclaje MAGUKs. Concretamente, los cambios parecen residir en la proteína Sap102, cuyos niveles totales y en membrana son dependientes de AhR. En base a esto decidimos comprobar si el mecanismo por el cual AhR media la regulación de estos procesos es a través de una interacción directa entre el receptor y la proteína de anclaje Sap102.

Para ello, realizamos experimentos de co-inmunoprecipitación de Sap102 y de AhR, mediante anticuerpos específicos para ambas proteínas, en animales sham y pMCAO tratados con vehículo y TMF, y evaluamos la interacción de Sap102 y AhR, así como de AhR con Sap102.

Como se observa en la **Figura 4.42**, los experimentos de co-inmunoprecipitación demostraron la interacción entre AhR y Sap102 en todos los grupos analizados, obteniéndose resultados similares al realizar la co-inmunoprecipitación de Sap102 y el posterior revelado para AhR (**Figura 4.42, A y B**), como al precipitar

AhR y detectar los niveles de Sap102 (**Figura 4.42, B y C**). En ambos casos, la isquemia incrementó la interacción de AhR con Sap102, mientras que el tratamiento con TMF en los animales pMCAO disminuyó significativamente esta interacción.

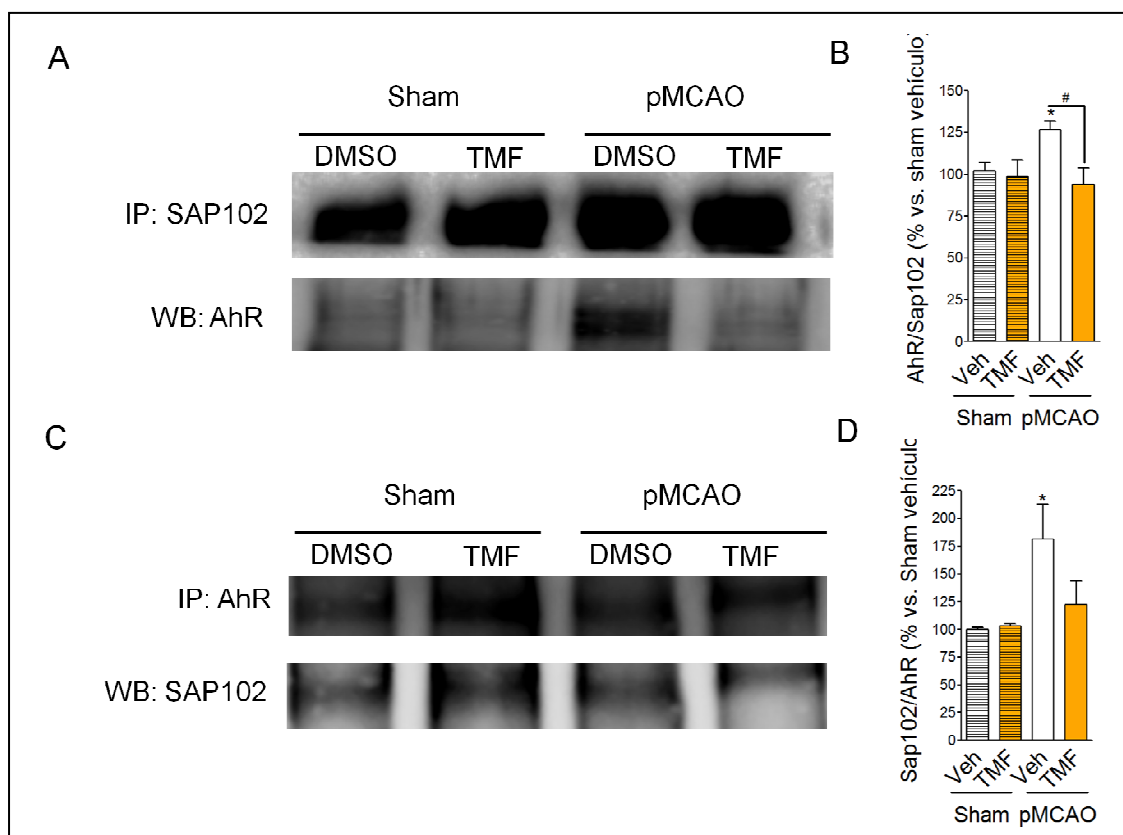


Figura 4.42. Interacción entre el receptor AhR y la proteína de anclaje Sap102. Experimentos de co-inmunoprecipitación de Sap102 (A-B) y AhR (C-D) en animales sham y pMCAO tratados con vehículo y TMF (6,2',4'-trimetoxiflavona) 24h tras la oclusión de la ACM. En (A) se muestran las imágenes representativas de los resultados obtenidos tras la co-inmunoprecipitación (IP) de Sap102 y la detección mediante western blot (WB) de AhR. (B) Cuantificación del % de interacción de Sap102 con AhR. Los datos se muestran como % de inducción *vs.* sham vehículo de AhR/Sap102 (n=3 por grupo; *p<0.05 *vs.* sham vehículo; #p<0.05 pMCAO vehículo). En (C) se muestran las imágenes representativas de los resultados obtenidos tras la co-inmunoprecipitación de AhR y la detección mediante western blot de Sap102. (D) Cuantificación del % de interacción de AhR con Sap102. Los datos se muestran como % de inducción *vs.* sham vehículo de Sap102/AhR (n=3 por grupo; *p<0.05 *vs.* sham vehículo; #p<0.05 pMCAO vehículo).

Estos resultados indican que, al menos en parte, la modulación de la señal de los receptores NMDA por AhR es dependiente de la interacción entre el receptor AhR y la proteína Sap102, ya que el tratamiento con el antagonista de

AhR TMF es capaz de modular esta interacción y promover los cambios previamente comentados para los receptores NMDA.

AhR es un factor de transcripción activado por ligando. Su distribución mayoritaria es citoplasmática en ausencia de ligando, y nuclear, en presencia de un agonista para el receptor. Dado que Sap102 es una proteína situada de manera principal en la membrana, y que la inhibición de AhR por su antagonista TMF es capaz de incrementar los niveles en membrana de la misma, e inhibir la interacción entre Sap102 y AhR, nos planteamos la posibilidad de que el receptor AhR estuviese localizado también en la membrana, lo que le permitiría interaccionar directamente con Sap102. Como se observa en la **Figura 4.43**, parte del receptor AhR se sitúa en la membrana celular tanto *in vivo* (**Figura 4.43, A y C**) como *in vitro* (**Figura 4.43, B y D**). Estos resultados fueron confirmados mediante el uso de dos anticuerpos diferentes para el receptor AhR, así como mediante diferentes protocolos de aislamiento de membranas celulares.

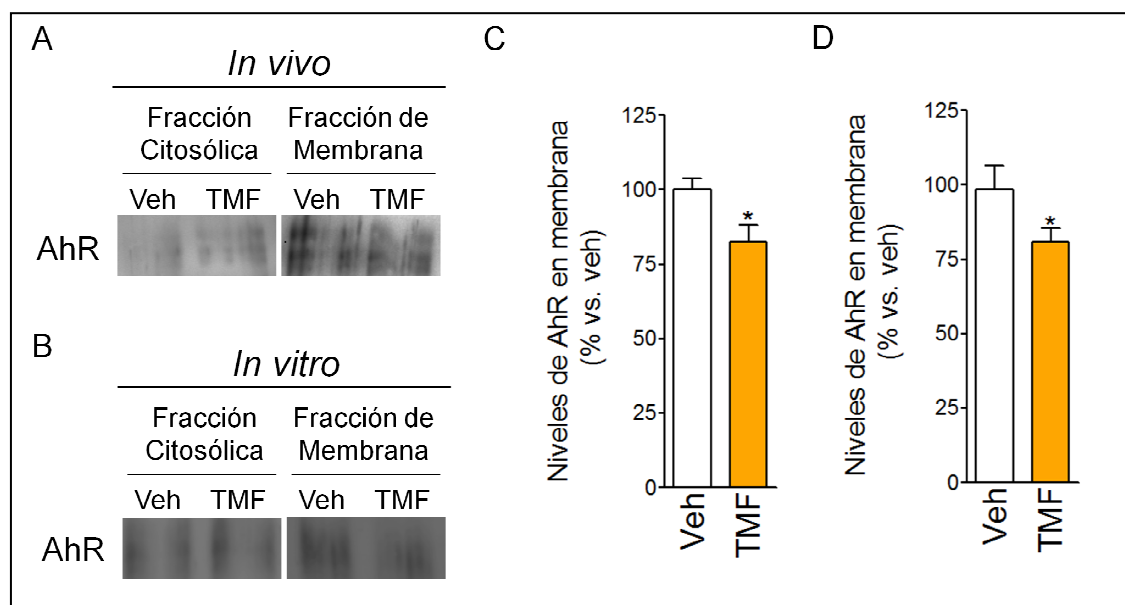


Figura 4.43. Niveles en membrana del receptor AhR. Caracterización de la expresión del receptor AhR en membrana en animales sometidos al tratamiento con vehículo y TMF (6,2',4'-trimetoxiflavona) tras pMCAO (**A**), y en cultivos neuronales tratados con vehículo y TMF (**B**). (**C y D**). Cuantificación del receptor AhR en membrana *in vivo* (**C**) e *in vitro* (**D**); (En **C**, n=4 por grupo; *<0.05 vs. pMCAO vehículo; En **D**, n=4 por grupo; *<0.05 vs neuronas vehículo).

Además, la localización en membrana del receptor AhR se redujo de manera parcial tras el tratamiento con el antagonista de AhR TMF, tanto en nuestro modelo *in vivo* (**Figura 4.43C**) como en nuestro modelo *in vitro* (**Figura 4.43D**).

Por tanto, estos resultados sugieren que la traslocación a la membrana del receptor AhR es un proceso, al menos en parte, dependiente de ligando.

4.3.2 Otros mecanismos promovidos por la modulación farmacológica de AhR en la isquemia cerebral: Mecanismos a nivel transcripcional

4.3.2.1 Efecto de la modulación farmacológica de AhR en la regulación génica promovida por CREB *in vivo* e *in vitro*

Como comentamos previamente en la Introducción, CBP es un coactivador transcripcional de AhR (Arany et al., 1996; Kallio et al., 1998; Kobayashi et al., 1997), y precisamente CREB, para ejercer su acción como factor de transcripción, también necesita interaccionar con CBP (Kwok et al., 1994). En este sentido, estudios previos (Lin et al., 2009; 2008) han demostrado que la inhibición de AhR mediante siRNAs específicos para el receptor así como su activación mediante TCDD, promueven, respectivamente, una mayor y menor capacidad de CBP para unirse a los elementos respuesta de CREB, lo que influye de manera directa en la transcripción de sus genes diana; así, la activación de AhR por TCDD incrementaba el reclutamiento de CBP al complejo transcripcional de AhR promoviendo la transcripción de los genes de respuesta a AhR y a consecuencia, disminuyendo los de CREB.

Por este motivo, decidimos evaluar si en nuestro modelo experimental, AhR era capaz de reclutar a CBP, pero también si se producía la formación de complejos AhR/CBP/CREB que pudiesen modificar la respuesta transcripcional de CREB en modelos de excitotoxicidad (**Figuras 4.44 y 4.45**).

Con este fin, realizamos experimentos de co-inmunoprecipitación de AhR *in vitro* e *in vivo* y evaluamos la posible interacción con CBP y con el factor de transcripción CREB. Como se observa en la **Figura 4.44 (paneles A-C)**, 5 horas tras la exposición de los cultivos neuronales a OGD, se incrementó la interacción de AhR con CBP así como con CREB. La inhibición de AhR mediante su antagonista TMF disminuyó de manera significativa esta interacción, mientras que su activación por el agonista L-Kyn incrementó los niveles de CBP y CREB en los complejos inmunes resultantes de la co-inmunoprecipitación de AhR.

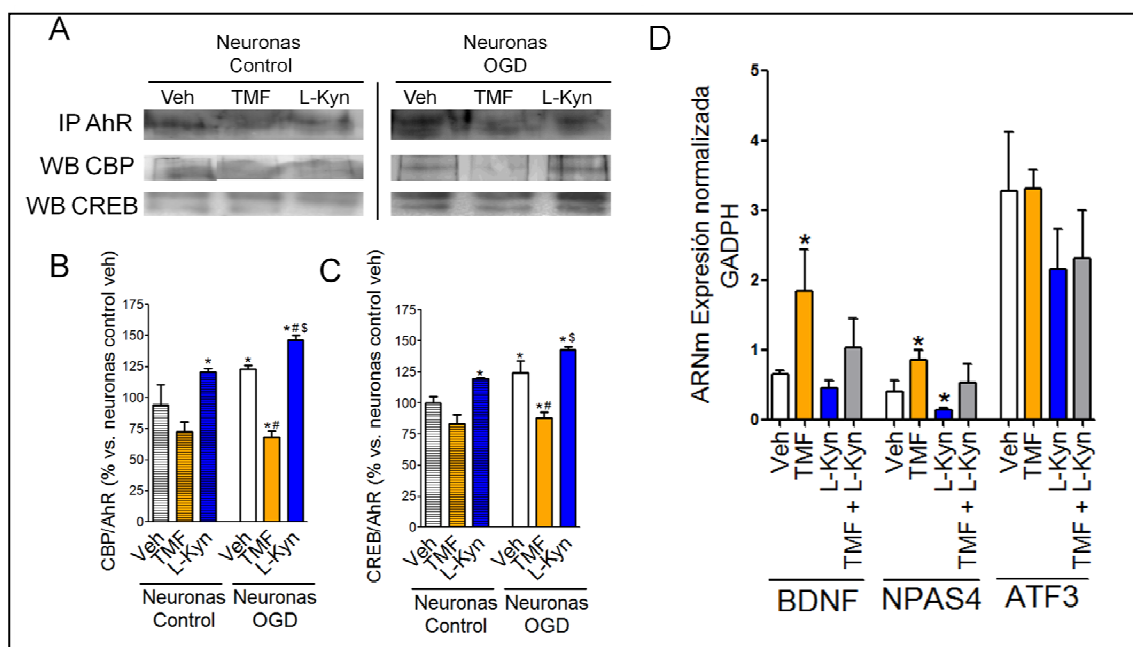


Figura 4.44. Efecto de la modulación farmacológica de AhR en su interacción con CBP y CREB y en la actividad transcripcional de CREB en cultivos neuronales. (A) Imágenes representativas de la co-inmunoprecipitación (IP) de AhR en neuronas control y neuronas OGD tras el tratamiento con vehículo, TMF (6,2',4'-trimetoxiflavona) o L-Kyn (L-kinurenina). En los complejos inmunoprecipitados se detectó la presencia de CBP (Proteína de unión a CREB) y el factor de transcripción CREB (proteína de unión al elemento respuesta del AMPc) mediante western blot (WB). (B-C) Cuantificación de la interacción de AhR con CBP (B) y con CREB (C) en neuronas control y OGD. Los datos se representan como el % de inducción vs. neuronas control vehículo (n=3 por grupo, *p<0.05 vs. neuronas control vehículo; #p<0.05 vs. neuronas OGD vehículo; \$p<0.05 vs. neuronas control L-Kyn). (D) Expresión de los genes diana de CREB BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), NPAS4 (Proteína neuronal PAS4) y ATF3 (Factor activador de la transcripción 3) en neuronas control y neuronas OGD 5 horas tras la OGD, determinada mediante RT-PCR. Los valores se normalizaron por GADPH (n=5 por grupo; *p<0.05 vs. neuronas control vehículo).

Además, al evaluar varios de los genes diana de CREB (**Figura 4.44, D**), observamos que el tratamiento con TMF incrementó de manera significativa los niveles de BDNF y NPAS4 en comparación con las neuronas tratadas con vehículo, observándose una tendencia contraria tras el tratamiento con L-Kyn. En el caso del gen ATF3, no se observaron cambios en ninguno de los tratamientos. De manera adicional, se determinaron los niveles de BDNF en extractos celulares totales y en el medio de cultivo de neuronas sometidas a OGD mediante un ensayo ELISA. Desgraciadamente, los resultados obtenidos se encontraron por debajo del umbral de detección del ensayo.

Finalmente, la interacción de AhR con CBP y CREB se confirmó mediante estudios de co-inmunoprecipitación realizados *in vivo*. Como se muestra en la **Figura 4.45 (paneles A-C)**, la isquemia produjo un incremento significativo de la interacción de AhR con CBP y con CREB, que se revirtió mediante el tratamiento con el antagonista de AhR TMF. El análisis *in vivo* de la concentración de BDNF mediante un ensayo ELISA nos mostró un ligero incremento de la concentración de BDNF en los animales sham tratados con TMF en comparación con los animales tratados con vehículo (**Figura 4.45, D**). Sin embargo, al analizar la concentración de BDNF en animales pMCAO tratados con vehículo y TMF, observamos que los niveles totales de BDNF no presentaban diferencias significativas entre ambos grupos (**Figura 4.45, D**). De hecho, existía una clara correlación significativa entre el volumen de infarto de los animales pMCAO tratados con vehículo y la concentración de BDNF, mientras que los ratones tratados con TMF no mostraban claramente esta correlación. Llamó nuestra atención que ante un menor volumen de infarto, el tratamiento con TMF presentó niveles similares de BDNF que los animales pMCAO tratados con vehículo. Por tanto, para la eliminar la elevación de BDNF debida al daño isquémico, realizamos la normalización de los niveles de BDNF por el volumen de infarto (**Figura 4.45E**), observándose en este caso un

incremento significativo de la concentración de BDNF en los ratones tratados con TMF. Por último, quisimos determinar si el incremento en la producción de BDNF se acompañaba, además, por una disminución de factores pro-apoptóticos. Aunque no observamos cambios en los niveles de Apaf-1 (datos no mostrados), el tratamiento con TMF tras la oclusión produjo una reducción significativa de p53 y Puma, al mismo tiempo que incrementó los niveles de la proteína anti-apoptótica bcl-x (Figura 4.45, paneles F-H).

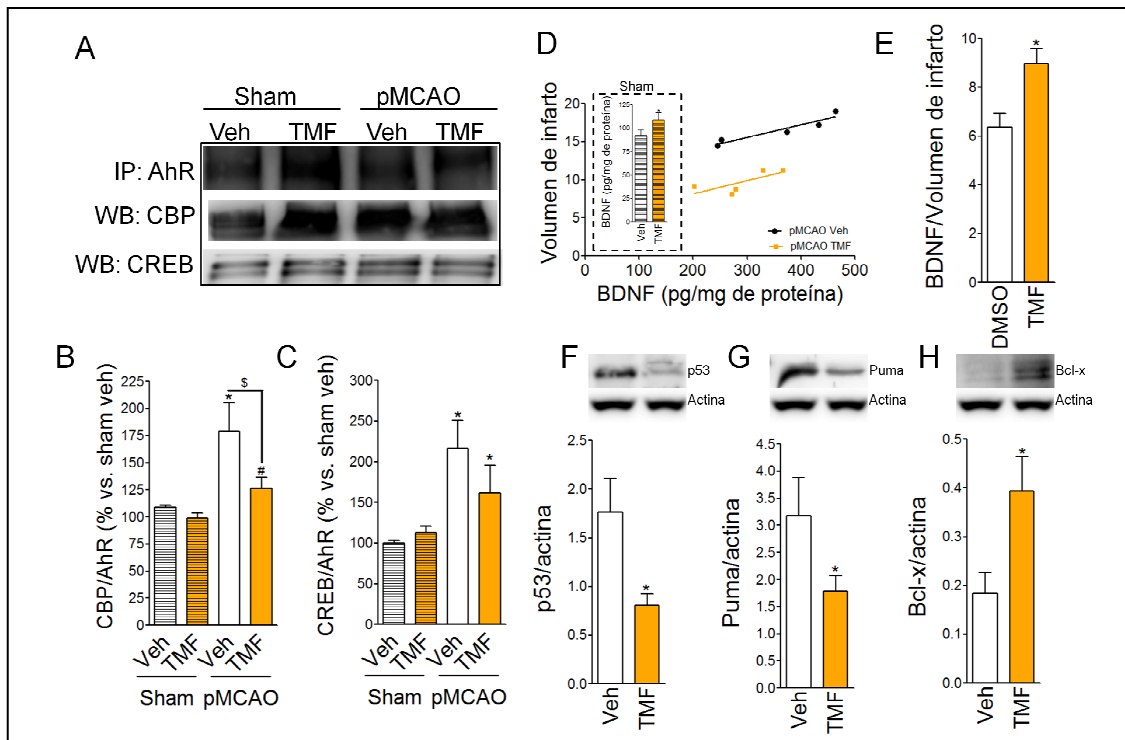


Figura 4.45. Efecto de la modulación farmacológica de AhR en su interacción con CBP y CREB y en la actividad transcripcional de CREB *in vivo*. (A) Co-inmunoprecipitación de AhR en animales sham y pMCAO tratados con vehículo o TMF. En los complejos inmunoprecipitados se detectó la presencia de CBP y CREB. (B-C) Cuantificación de la interacción de AhR con CBP (B) y con CREB (C) en animales sham y pMCAO. Los datos se representan como el % de inducción vs. animales sham vehículo (n=3 por grupo; *p<0.05 vs. sham vehículo; #p<0.05 vs. pMCAO vehículo). (D) Concentración de BDNF en animales pMCAO vehículo y TMF, determinada mediante un ensayo ELISA y representado con respecto a su volumen de infarto (pMCAO vehículo r=0.945; p>0.05; pMCAO TMF r=0.748; p=0.151). La gráfica recuadrada en el interior representa la concentración de BDNF en animales sham vehículo y TMF (n=6 por grupo; *p<0.05 vs. sham vehículo) (E) Concentración de BDNF normalizada por el volumen de infarto (n=5 por grupo; *p<0.05 vs. pMCAO vehículo). (F-H) Cuantificación de los niveles de p53 (F), Puma (G) y bcl-x (H) en animales pMCAO vehículo y animales pMCAO tratados con TMF. La actina se utilizó como control de carga (n=6 por grupo; *p<0.05 vs. pMCAO vehículo).

Estos resultados sugieren que los efectos neuroprotectores y deletéreos promovidos por la inhibición y activación de AhR mediante TMF y L-Kyn, respectivamente, son en parte debidos a su interacción con CBP y CREB, y la inhibición de la actividad transcripcional de CREB.



DISCUSIÓN

5.1 EXPRESIÓN Y ACTIVACIÓN DE AHR TRAS MODELOS EXPERIMENTALES DE ISQUEMIA CEREBRAL

5.1.1 Patrón de expresión de AhR tras isquemia cerebral

Hasta la fecha, son escasos los estudios sobre la función de AhR en el cerebro y nulos, en lo referente a su posible implicación en la isquemia cerebral. Los resultados mostrados en esta Tesis doctoral muestran por primera vez cómo, tras isquemia cerebral en ratón, la expresión del receptor AhR se incrementa siguiendo un patrón temporal y espacial concreto. Tanto en los estudios realizados mediante inmunofluorescencia como en los llevados a cabo mediante western blot, hemos demostrado que los niveles proteicos de AhR se incrementan significativamente en la región del *core* y, sobre todo, en la región del peri-infarto.

Pese a observar un incremento en la expresión de AhR a nivel de proteína, no detectamos una inducción similar en los niveles de ARNm del receptor, observando además una disminución a las 72 horas tras la oclusión. Este hecho puede ser debido a diferentes razones. Los niveles de AhR están sometidos a un complejo proceso de regulación, que incluye entre otros mecanismos, su degradación por el proteasoma 26S una vez que el receptor ha finalizado su acción dependiente de ligando (Berg y Pongratz, 2002; Furness et al., 2007; Pollenz, 2002). Si AhR no se degrada, el receptor continúa activo, acumulándose y ejerciendo su acción de manera continuada (Davarinos y Pollenz, 1999). Tras la isquemia cerebral, el proteasoma presenta un funcionamiento defectivo (Hochrainer et al., 2012; Hu et al., 2001; Zhang et al., 2006) que podría mediar un incremento en la expresión proteica de AhR al no ser degradado, en donde la disminución observada a las 72 horas sería básicamente un mecanismo de retroalimentación negativo para contrarrestar su ausencia de degradación. El motivo también puede ser simplemente una cuestión metodológica, ya que la

región seleccionada para el análisis de ARNm incluyó la zona del *core* + peri-infarto y, a diferencia, los análisis a nivel proteico se realizaron en ambas regiones por separado. Es posible que, dada la expresión mayoritaria de AhR en el peri-infarto, el *core* actúe como un factor de dilución, impidiéndonos detectar el incremento en la expresión a nivel de ARNm. De igual forma, tal vez, los tiempos seleccionados para el análisis no fueron los adecuados.

Sin duda, uno de los resultados más llamativos en torno a la expresión de AhR, son los cambios observados a nivel de la corteza somatosensorial contralateral e ipsilateral sana, así como en el estriado. Tras una lesión isquémica focal se producen alteraciones metabólicas, cambios a nivel de neurotransmisores, así como un proceso de degeneración axónica, que va a afectar no solo al hemisferio lesionado sino también al hemisferio contralateral sano (Seitz et al., 1999). En este sentido, el término diasquisis hace referencia a cambios funcionales que se producen en estructuras remotas del cerebro alejadas de la zona lesionada, y que tienen como principal función participar en la recuperación funcional. Dependiendo de la zona dañada, los cambios en estructuras remotas presentan una topografía concreta. Todas las regiones remotas en donde detectamos cambios en la expresión del receptor AhR presentan conexiones con la zona ipsilateral lesionada, principalmente mediadas a través de las proyecciones de tipo calloso (Fame et al., 2011). En distintos tipos celulares, AhR actúa como sensor capaz de detectar la pérdida de contactos celulares (Cho et al., 2004; Oesch-Bartlomowicz et al., 2005). Es posible que, de manera similar, la pérdida de conexiones neuronales provenientes de la zona lesionada induzca la expresión de este receptor en la corteza ipsilateral sana, en la corteza contralateral así como en el estriado de ambos hemisferios. Estos resultados abren las puertas a futuros estudios que evalúen la implicación del receptor AhR en los procesos de remodelación y plasticidad que sufre el cerebro tras un ictus isquémico.

La expresión del “compañero” transcripcional de AhR ARNT (Traslocador del receptor AhR), también se incrementa tras la isquemia cerebral; sin embargo, los niveles de esta proteína muestran un patrón temporal y regional diferente al observado para AhR, ya que la expresión de ARNT es mayoritaria en el *core* y, tras una pequeña inducción a causa de la isquemia, sus niveles permanecen más o menos estables. ARNT se expresa de manera constitutiva en todos los tipos celulares. Este factor de transcripción es también denominado HIF- β (Factor inducible por hipoxia β), siendo esencial para la formación de HIF-1, al interaccionar con el factor HIF- α (revisado en Kewley et al., 2004). El complejo HIF-1 participa en la aclimatación celular ante bajos niveles de oxígeno (Sharp y Bernaudin, 2004), por lo que su expresión y activación se induce en todos los tipos celulares tras la isquemia cerebral (Singh et al., 2012). Por tanto, la participación de ARNT en el complejo HIF-1 explicaría los diferentes patrones de expresión observados entre AhR y ARNT.

5.1.2 Localización neuronal de AhR tras isquemia cerebral

El estudio de la expresión *in vivo* de AhR tras isquemia indica que su localización es mayoritariamente neuronal. Este hecho nos resultó bastante llamativo, ya que, dada la implicación de este receptor en la regulación de la respuesta inmune en diferentes contextos fisiológicos y patológicos (ver revisiones de Esser et al., 2009; Platten et al., 2012), esperábamos encontrar su expresión asociada a células con un fenotipo inmune. Sin embargo, tal y como demuestran nuestros resultados *in vivo* y los obtenidos en nuestro modelo *in vitro*, en el cerebro normal y en el cerebro isquémico, la principal localización del receptor es neuronal. La expresión de AhR en el cerebro adulto ya había sido demostrada previamente por otros grupos en la corteza, el hipocampo y el cerebelo (Filbrandt et al., 2004; Khanna et al., 2013; Lin et al., 2008; 2009). A nivel celular se ha detectado su expresión principalmente en neuronas, astrocitos y células endoteliales cerebrales (Filbrandt et al., 2004; Khanna et al., 2013; Lin et

al., 2008; 2009). En nuestro caso, aunque la principal fuente de expresión es neuronal, hemos comprobado que, de manera minoritaria, algún astrocito reactivo situado en la región de peri-infarto expresa AhR tras la isquemia, por lo que no podemos descartar su contribución aunque esta sea marginal. De igual forma, en este estudio no hemos evaluado la expresión de AhR en las células endoteliales, por lo que no podemos descartar que contribuyan a las acciones del receptor tras la isquemia cerebral.

Nuestros resultados son indicativos de que la acción del receptor AhR tras isquemia cerebral se produce de manera principal a nivel del SNC, con una escasa o nula contribución periférica. De hecho, datos no publicados de mi equipo de investigación muestran que el número de los principales tipos de células inmunes, así como los niveles de quimioquinas, interleuquinas y demás factores inflamatorios a nivel periférico y central, no participan en el proceso de neuroprotección mediado por la inhibición del receptor AhR. Todos estos resultados apoyan que, en el proceso isquémico, las principales acciones de AhR tienen lugar en la neurona.

5.1.3 Activación del receptor AhR tras isquemia cerebral

Nuestros resultados no solo muestran que la isquemia induce la expresión de AhR en neuronas sometidas al daño isquémico sino que, además, incrementa su traslocación al núcleo y su actividad transcripcional en modelos de isquemia experimental *in vivo* e *in vitro*. La localización celular de AhR es un proceso sumamente regulado y mayoritariamente dependiente de ligando (Ikuta et al., 1998; 2000), de tal forma que, en ausencia de ligando, el receptor se sitúa en el citoplasma formando un complejo inactivo con la chaperona HSP90 (Proteína de choque térmico 90), la proteína AIP1 (Proteína de interacción con AhR) y la co-chaperona p23 (Carver y Bradfield, 1997; Ma y Whitlock, 1997; Meyer et al., 1998), mientras que al activarse por un agonista, el receptor se trasloca al

compartimento nuclear para ejercer su acción como factor de transcripción. A este respecto, nuestros resultados muestran que en las neuronas de la corteza somatosensorial ipsilateral de los animales sham, AhR se distribuye de manera homogénea entre el núcleo y el citoplasma. Sin embargo, tras el proceso isquémico, se produce un incremento en la traslocación nuclear de AhR que alcanza su punto máximo a las 18 horas tras la oclusión. Esta respuesta fue similar en los cultivos neuronales sometidos a OGD (Privación de oxígeno y glucosa), corroborando que AhR se activa a consecuencia de la isquemia. Esta activación se ve confirmada por el hallazgo de que la isquemia induce la expresión de los genes diana típicos de AhR como son Cyp1a1 y AhRR (El represor de AhR), frecuentemente utilizados para evaluar el grado de activación del receptor (Beischlag et al., 2008; Furness y Whelan, 2009; Hankinson, 1995). Ya que mayoritariamente la actividad transcripcional de AhR es dependiente de ligando, estos resultados además sugieren la presencia de un agonista endógeno inducido por la isquemia responsable del incremento en la actividad transcripcional del receptor.

La presencia de AhR en las neuronas de los animales sham y en las neuronas control de los cultivos neuronales, así como su distribución homogénea entre el núcleo y el citoplasma, nos sugiere sin duda la participación de este receptor en el normal funcionamiento neuronal, por lo que la alteración de la ruta de señalización de AhR en las neuronas podría afectar drásticamente a la supervivencia de las mismas. Cabe destacar que, en determinadas neuronas situadas en la región de peri-infarto, la presencia de AhR en el núcleo se observa a tiempos cortos tras la isquemia, como son 3 y 5 horas. Esta activación temprana de AhR podría jugar un papel decisivo en el destino de la neurona, participando en la decisión de si la neurona es reclutada para formar parte del *core* o si, por el contrario, resulta ilesa ante el estímulo citotóxico.

5.2 AHR COMO MEDIADOR DEL DAÑO EN FASE AGUDA EN MODELOS EXPERIMENTALES DE ISQUEMIA CEREBRAL

5.2.1 Neuroprotección mediada por antagonistas de AhR en isquemia cerebral y excitotoxicidad *in vivo* e *in vitro*

Nuestros resultados ponen de manifiesto, por primera vez, que la inhibición en fase aguda del receptor AhR mediante diferentes antagonistas, TMF (6,2',4'-trimetoxiflavona) y CH (CH-223191) es neuroprotectora en nuestro modelo *in vivo* de isquemia cerebral experimental, presentando en ambos casos una reducción de los déficits neurológicos y una drástica reducción en el volumen del infarto. Ambos compuestos son antagonistas específicos del receptor AhR que han sido utilizados en numerosas ocasiones en modelos *in vitro* (Choi et al., 2012; DiNatale et al., 2012; Murray et al., 2010a; 2010b; Zhao et al., 2010) aunque, en el caso del antagonista TMF, hasta ahora nunca se había evaluado *in vivo*. Aunque ambos antagonistas reducen el volumen de infarto de manera significativa, la neuroprotección mediada por el antagonista TMF es mayor. Estas diferencias pueden deberse al diferente mecanismo de acción de los antagonistas empleados, ya que la TMF es capaz de competir no solo con ligandos de tipo HAHs (Hidrocarburos aromáticos halogenados) sino también de tipo PAHs (Hidrocarburos aromáticos policíclicos) (Murray et al., 2010a). Por tanto, es posible que el ligando de AhR inducido por la isquemia presente una mayor susceptibilidad a la inhibición por TMF que por CH.

El efecto neuroprotector de la inhibición de AhR mediante el antagonista TMF se confirmó también en nuestro modelo *in vitro*. Tanto en el modelo de excitotoxicidad por NMDA como tras la OGD, la inhibición del receptor AhR resultó neuroprotectora. Estos resultados confirman los de Lin y colaboradores (Lin et al., 2008; 2009), que muestran que la inhibición de AhR mediante siRNAs específicos para el receptor reducía la excitotoxicidad mediada por una

concentración tóxica NMDA. Además de la neuroprotección que hemos observado con el antagonista tras ser administrado de manera posterior al estímulo citotóxico, el pretratamiento de los cultivos neuronales con TMF también redujo significativamente la muerte neuronal. Estos resultados sugieren que la inhibición de AhR en condiciones basales produce cambios en la neurona que son capaces de proteger a la misma o “precondicionar” contra el posterior estímulo citotóxico, lo que apoya un papel fisiológico de AhR en el funcionamiento neuronal.

5.2.2 Neuroprotección mediada por la delección parcial del receptor AhR en ratones heterocigotos

Quisimos confirmar nuestros resultados utilizando ratones nulos para AhR. Desgraciadamente, la alta tasa de mortalidad en este grupo de animales nos dificultó dicha tarea. Curiosamente, los únicos dos animales AhR^{-/-} en los que se pudo evaluar el volumen de infarto presentaron resultados sumamente dispares, siendo uno de los infartos de tipo hemisférico. Dado el relevante papel de AhR en el sistema vascular, y los múltiples defectos que los ratones nulos para AhR presentan en su vasculatura, no sería de extrañar que este tipo de infarto fuera debido a alteraciones en el sistema vascular que afecten al SNC (Fernández-Salguero et al., 1997; Lund et al., 2003; 2005; 2006; Thackaberry et al., 2002; Zhang et al., 2010a). Por el contrario, los animales heterocigotos para AhR carecen de este tipo de defectos y, dada su reducción del 70% en los niveles de expresión proteica de AhR, pensamos que sería un buen modelo para corroborar lo ya observado con los antagonistas de AhR. Efectivamente, la delección génica parcial de AhR resultó neuroprotectora en nuestro modelo experimental de isquemia cerebral, confirmando así que la inhibición de AhR en fase aguda induce neuroprotección y, por tanto, podría ser utilizada como aproximación terapéutica para el tratamiento del ictus isquémico.

5.3 L-KINURENINA COMO LIGANDO ENDÓGENO DE AHR TRAS ISQUEMIA CEREBRAL

5.3.1 La ruta de las kinureninas tras isquemia cerebral en ratón

Recientemente, varios estudios han identificado a la L-kinurenina como un ligando endógeno de AhR en diferentes tipos celulares (Adams et al., 2012; DiNatale et al., 2010; Hao et al., 2013; McBerry et al., 2012; Opitz et al., 2011). Este agonista de AhR se genera a partir de la denominada “ruta de las kinureninas”, la cual comprende la degradación del L-triptófano (Trp) a través de una serie de reacciones enzimáticas, teniendo como fin la producción del cofactor enzimático NAD⁺. Como consecuencia del metabolismo del triptófano por esta vía, se generan una serie de productos intermedios a los cuales se los conoce globalmente como “kinureninas”. Entre estos, se incluye el metabolito L-kinurenina (L-Kyn), producto limitante de la ruta ya que, a partir del mismo, se formarán el resto de subproductos (Bertazzo et al., 2001; Rose, 1972). La L-kinurenina puede metabolizarse a través de 3 vías diferentes para formar ácido kinurénico, 3-hidroxi-L-kinurenina y ácido antranílico, a través de la acción de las enzimas kinurenina aminotransferasa, kinurenina-3-monooxigenasa y kinureninasa, respectivamente (revisado en Vécsei et al., 2013). Entre estos subproductos, también se genera ácido quinolínico, un potente agonista de los receptores NMDA, implicado en numerosas patologías del SNC entre las que se incluye el ictus isquémico; pero también se genera ácido kinurénico que, por el contrario, presenta acciones antagónicas frente a los receptores NMDA (Chung y Gadupudi, 2011; Gold et al., 2011; Schwarz et al., 2012; Stone et al., 2012a; 2012b; Zinger et al., 2011; ver revisión de Vécsei et al., 2013). De hecho, esta ruta ha cobrado gran interés como posible diana farmacológica dadas sus múltiples posibilidades terapéuticas. Así, en el ictus, su inhibición en diferentes modelos animales resulta neuroprotectora. Además, diversos estudios clínicos muestran

cómo los niveles plasmáticos de L-kinurenina se correlacionan de manera directa con un peor pronóstico y una mayor tasa de mortalidad (Darlington et al., 2007; Gold et al., 2011). Dado que nuestros resultados en modelos experimentales de isquemia cerebral mostraban que AhR es un mediador del daño en fase aguda, y que la L-kinurenina se había descrito como ligando endógeno de AhR (Adams et al., 2012; DiNatale et al., 2010; Hao et al., 2013; McBerry et al., 2012; Opitz et al., 2011), cabía la posibilidad de que parte de los efectos deletéreos ocasionados por la ruta de las kinureninas se debiesen a la activación del receptor AhR por el ligando L-kinurenina.

Aunque existen varios estudios que muestran que el metabolito L-kinurenina incrementa su concentración en plasma, LCR (líquido cefalorraquídeo) y cerebro tras isquemia (Heyes y Nowak, 1990; Heyes et al., 1993; Saito et al., 1993), decidimos determinar si en nuestro modelo experimental existía un incremento local de L-kinurenina, que permitiese la activación del receptor AhR tras la isquemia. En efecto, nuestros resultados muestran cómo la isquemia induce un incremento en la concentración cerebral de L-kinurenina a las 16 horas tras pMCAO (Oclusión permanente de la arteria cerebral media). Este es un punto realmente interesante, ya que el incremento temporal de la concentración de L-kinurenina coincide con el punto máximo de localización nuclear de AhR observado tras la isquemia. Estos resultados apoyan la idea de que la L-kinurenina actúa como ligando endógeno de AhR tras un ictus isquémico. Aunque también observamos un incremento de la concentración de L-kinurenina en el cerebro a las 3 horas tras la oclusión, esta inducción se observa de manera similar en animales sham a 3 horas tras la cirugía, lo que sugiere que este incremento es debido al estrés post-cirugía (Kiank et al., 2010) y que no es un efecto específico de la isquemia cerebral.

Nuestros resultados también muestran un incremento significativo en los niveles plasmáticos de L-kinurenina, tanto a nivel de concentración total, como

expresado a través del ratio L-Kyn/Trp. Estos resultados están de acuerdo con los niveles plasmáticos de L-kinurenina obtenidos en modelos experimentales de ictus isquémico, así como en humanos (Darlington et al., 2007; Gold et al., 2011; Heyes y Nowak, 1990; Heyes et al., 1993; Saito et al., 1993; Stone et al., 2012b) y sugieren su posible utilidad diagnóstica y pronóstica.

En el SNC, aproximadamente el 40% de la L-kinurenina se genera localmente, mientras que el 60% restante procede de la circulación (Gál y Sherman, 1978, 1980), atravesando la barrera hematoencefálica gracias a un transportador de aminoácidos neutros (Pardridge, 1998). En nuestro modelo, no somos capaces de discriminar la contribución periférica de la local, en lo que respecta al incremento observado en el cerebro tras pMCAO. Sin embargo, la inducción de la enzima TDO (Tryptófano-2,3-dioxigenasa) 5 horas tras la isquemia es indicativa de que, al menos en parte, existe una producción local de L-kinurenina. Aunque la TDO fue inicialmente caracterizada como una enzima hepática, su expresión y función es también neuronal (Guillemin et al., 2007; Thackray et al., 2008). De hecho, es interesante destacar que, en el estudio realizado por Opitz y colaboradores (Opitz et al., 2011), la expresión constitutiva de la enzima TDO en células tumorales neuronales es la responsable del incremento en la concentración de L-kyn que, de manera posterior, media la activación de AhR. Es posible que un mecanismo similar sea inducido por la isquemia a tiempos tempranos, incrementando la expresión neuronal de TDO y, por tanto, la concentración de L-kinurenina.

No existen en el mercado anticuerpos específicos para la enzima TDO de ratón y rata, lo que nos ha impedido determinar si el incremento cerebral de la enzima TDO es de localización neuronal. Además de la TDO, la producción de L-kinurenina se lleva a cabo por una segunda enzima, la IDO (indolamina-2,3-dioxigenasa), cuya actividad se induce principalmente por la exposición a interferón γ como consecuencia de procesos inflamatorios (Carlin et al., 1989;

Takikawa et al., 1990). Aunque su expresión es ubicua, su inducción se produce mayoritariamente en células de tipo inmune y en células gliales (Guillemin et al., 2003a; 2005; Saito et al., 1993), por lo que su actividad tras la isquemia a nivel local adquiere mayor relevancia a tiempos más tardíos, coincidiendo con los picos de infiltración de las células inmunes en el cerebro isquémico y picos de activación de las células gliales residentes (Gelderblom et al., 2009; Stevens et al., 2002). Sin embargo, también existen varios estudios que muestran que, tras la isquemia, la inducción de la enzima IDO puede tener un origen neuronal (Hoshi et al., 2009; Taguchi et al., 2008).

Por tanto, tras la isquemia cerebral, ya sea producida por TDO y/o por IDO, parte de la L-kinurenina generada puede ser de origen neuronal, posibilitando, además del paracrino, un modelo autocrino en donde la producción de L-kinurenina por la neurona activaría a su propio receptor AhR, incrementando su activación y, finalmente, mediando sus efectos deletéreos en la fase aguda del ictus isquémico. Este es un punto realmente importante a tener en cuenta con el fin de poder extrapolar los resultados obtenidos en nuestros modelos *in vitro*, basados en cultivos puros de neuronas y donde la contribución de otros tipos celulares es minoritaria o nula.

Aunque los niveles plasmáticos de triptófano permanecen inalterados, en el cerebro hemos observado un incremento transitorio en la concentración de este aminoácido que está de acuerdo con lo observado previamente en diferentes modelos experimentales de isquemia cerebral (Heyes y Nowak, 1990; Heyes et al., 1993; Maruki, 1989; Saito et al., 1993). El mecanismo responsable de este incremento se desconoce, pero podría deberse a una reducción de la síntesis proteica, a un incremento en la fragmentación de proteínas, o a una disminución de la actividad de las enzimas encargadas de su metabolismo. De igual forma, la elevación del L-triptófano en el cerebro podría deberse a una mayor entrada procedente de la circulación, ya que el mismo transportador que

permite la entrada de L-kinurenina al cerebro también posibilita la entrada del L-triptófano (Fukui et al., 1991). Esto facilitaría, por tanto, una mayor producción local de L-kinurenina en el cerebro.

5.3.2 Caracterización de L-kinurenina como agonista de AhR tras isquemia cerebral experimental

Nuestros resultados demuestran que el tratamiento de las neuronas corticales con L-kinurenina induce la traslocación de AhR al núcleo. Además, incrementa la actividad transcripcional del receptor, ya que induce la expresión de dos de sus genes diana, Cyp1a1 y Cyp1b1. Este efecto es completamente dependiente de AhR, como demuestra su inhibición mediante el antagonista TMF. Estos resultados corroboran que, al igual que en otros tipos celulares (Adams et al., 2012; DiNatale et al., 2010; Hao et al., 2013; McBerry et al., 2012; Opitz et al., 2011), el metabolito derivado del triptófano L-kinurenina es un agonista endógeno de AhR. Un hallazgo interesante es que el tratamiento de las neuronas con L-kinurenina interfiere en el patrón temporal de traslocación de AhR observado tras la isquemia en cultivos neuronales ya que, mientras la localización nuclear de AhR se incrementa a las 3 horas tras la OGD alcanzando su punto máximo a las 24 horas, la administración exógena de L-Kyn adelanta el patrón temporal de traslocación de AhR, observándose el pico máximo de localización nuclear del receptor 1 hora tras la administración de la L-kinurenina. Transcurrido ese tiempo, los niveles nucleares de AhR retornan a los observados en las neuronas control en ausencia de tratamiento. Estos resultados sugieren que, tras la OGD, la síntesis del ligando endógeno responsable de la activación de AhR debe comenzar a las 3 horas. Un mecanismo similar se observa tras el tratamiento con el agonista típico de AhR TCDD, utilizado como control positivo de activación de AhR para este ensayo.

Nuestros resultados sugieren que la formación de L-Kyn endógena mediaría la activación de AhR inducida por la OGD, ya que la inhibición farmacológica de la enzima TDO en cultivos neuronales bloquea la traslocación de AhR al compartimento nuclear en respuesta a la isquemia 5 horas tras la OGD. Además, la inhibición de este enzima reduce la expresión del gen diana de AhR Cyp1b1 aunque no modifica la expresión de Cyp1a1 al tiempo en el que se realizó el análisis. Aunque ambos son genes diana de AhR, su expresión es contexto dependiente, sigue un patrón temporal específico y, mientras que Cyp1b1 suele expresarse de manera constitutiva e inducida, la expresión de Cyp1a1 suele ser inducida, siendo además la expresión de ambos genes dependiente del ligando inductor (Ciolino et al., 1999; Schrenk, 1998; Zhang et al., 1998). En base a esto, es bastante probable que el perfil temporal de expresión de ambas enzimas en las neuronas sea diferente y de ahí las diferencias observadas en su regulación y la inhibición diferencial observada en nuestros ensayos. Por tanto, en su conjunto, estos resultados apoyan un modelo de producción autocrina de L-kinurenina por la propia neurona, en donde la inhibición de la síntesis de este metabolito es capaz de disminuir la activación del receptor AhR en los cultivos neuronales.

En una situación *in vivo*, como la isquemia cerebral, dilucidar de dónde proviene la L-kinurenina cerebral es extremadamente difícil. Lo primero y como dijimos con anterioridad, su producción puede ser periférica pero además, en el caso de la contribución local, la producción puede estar mediada por diferentes tipos celulares, entre los que se incluyen las neuronas, los astrocitos, la microglía y las células infiltradas (Guillemin et al., 2003a; 2005). Todas estas células presentan la maquinaria adecuada para la conversión del triptófano en L-kinurenina y es probable que, de manera conjunta, contribuyan en mayor o menor medida a la producción de L-Kyn en el cerebro.

Ya que en los cultivos neuronales podíamos modular la actividad de AhR mediante la adición de L-kinurenina exógena o por la inhibición de la síntesis endógena de L-kinurenina, decidimos comprobar si este mismo efecto se producía en nuestro modelo *in vivo*. Puesto que el análisis *in vivo* de las enzimas encargadas de la conversión del triptófano en L-kinurenina mostraba una inducción específica de la TDO, pero no de la IDO, decidimos focalizar nuestra atención en la primera. En efecto, la administración del inhibidor de TDO abolió la traslocación de AhR al núcleo inducida por la isquemia; sin embargo, no conseguimos detectar el efecto opuesto cuando se administró L-kinurenina. Por el contrario, la administración de L-Kyn a los tiempos analizados, 4 y 24 horas tras la oclusión, disminuyó la traslocación de AhR inducida por la isquemia en el cerebro. Este hallazgo nos recordó a lo observado *in vitro*, en donde el tratamiento de los cultivos neuronales con L-kinurenina adelantaba el patrón temporal de traslocación de AhR inducido por la isquemia. Al ser activado por un ligando y una vez finalizada su acción, AhR es transportado al citoplasma, ubiquitinado y degradado por el proteasoma 26S (Berg y Pongratz, 2002; Furness et al., 2007; Pollenz, 2002); como consecuencia, tras la activación por un agonista, los niveles de AhR disminuyen drásticamente. Es probable que la disminución observada tras isquemia en presencia de L-kinurenina sea debida a este mecanismo de regulación negativa al que AhR se encuentra sometido para finalizar su acción.

5.3.3 Efecto de la administración de L-kinurenina en modelos experimentales de isquemia cerebral

Nuestros resultados muestran que el tratamiento de los cultivos neuronales con L-kinurenina incrementa el porcentaje de muerte tras la OGD y tras la exposición a concentraciones tóxicas de NMDA, no afectando a la viabilidad neuronal en condiciones basales. Este incremento en la muerte neuronal es AhR dependiente, ya que la administración conjunta con el antagonista TMF redujo

el porcentaje de mortalidad en los cultivos neuronales. Es interesante destacar que este efecto es dependiente de la edad del cultivo neuronal. Estudios previos han demostrado que la neuroprotección mediada por la inhibición de AhR ante estímulos citotóxicos depende de la actividad sináptica de la neurona (Lin et al., 2008), un hecho que de manera directa se correlaciona con la madurez de la misma. Aunque como hemos mostrado, en los cultivos neuronales de 14 DIV la inhibición y activación de AhR resultan en neuroprotección y daño respectivamente, estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que, en los cultivos neuronales inmaduros, la inhibición de AhR no resulta neuroprotectora ante modelos de excitotoxicidad y, por ende, la activación por su agonista L-kinurenina no presenta ningún efecto en la muerte neuronal.

En efecto, dependiendo del grado de maduración de la neurona, los cultivos neuronales presentan un mayor o menor grado de susceptibilidad a la excitotoxicidad mediada por glutamato y NMDA (Lee et al., 2000). Esta susceptibilidad diferencial depende en gran medida de la expresión de proteínas implicadas en la transmisión sináptica a lo largo del proceso de maduración neuronal (Kitamura et al., 2007). De hecho, el caso más destacado es el de los receptores NMDA, en donde la maduración de la neurona induce el incremento de la subunidad NR2A, que hasta entonces era prácticamente inexistente (Monyer et al., 1994; Watanabe et al., 1993). Es probable, por tanto, que la diferente susceptibilidad de los cultivos neuronales sea debida a cambios en las proteínas sinápticas y a la actividad de los receptores NMDA y/o a su localización, distribución y composición.

Mientras que, en nuestros resultados, L-Kyn presenta un efecto deletéreo en modelos de excitotoxicidad, existen varias publicaciones que muestran que la administración de L-kinurenina sulfato en modelos animales de isquemia cerebral es neuroprotectora (Gigler et al., 2007; Robotka et al., 2008; Sas et al., 2008). La base de la L-kinurenina como agente neuroprotector radica en su

capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, y su posterior conversión a ácido kinurénico o KYNA, otro derivado de la ruta de las kinureninas, sintetizado de manera mayoritaria por los astrocitos (Guillemin et al., 2005) y que presenta acciones antagónicas de los receptores NMDA. La administración de altas dosis de L-kinurenina sulfato, durante varios días consecutivos conjuntamente con probenecid, un inhibidor del transporte de ácidos orgánicos, (Gigler et al., 2007; Robotka et al., 2008; Sas et al., 2008), incrementaría los niveles de KYNA en el cerebro, bloqueando a los receptores NMDA y, por tanto, mediando neuroprotección.

No podemos descartar que la administración de altas dosis de L-Kyn sea capaz de incrementar los niveles de ácido kinurénico y, por tanto, reducir el daño ocasionado tras la isquemia cerebral. Sin embargo, en nuestros estudios de isquemia experimental *in vivo* no observamos un efecto neuroprotector mediado por L-Kyn. Sin embargo sí que observamos que, al administrar de manera conjunta L-Kyn con el antagonista de AhR TMF, la neuroprotección mediada por este antagonista se revierte, sugiriéndonos de nuevo la acción agonista de L-kinurenina en el receptor AhR.

Por último, para confirmar que la producción de L-kinurenina endógena participa en el daño isquémico, en una primera aproximación inhibimos farmacológicamente a la enzima TDO tras la isquemia cerebral mediante una única administración intraperitoneal del inhibidor 680C91 (Salter et al., 1995), a una dosis de 10 mg/Kg, 10' tras la oclusión de la ACM. Contrariamente a lo esperado, no detectamos diferencias en el volumen de infarto en comparación con el grupo de animales tratados con vehículo, ni a las 24 horas (determinado mediante RMN) ni a las 48 horas (determinado mediante TTC).

Cuando evaluamos la concentración de triptófano en el cerebro, observamos que, de manera temprana y transitoria, éste tiende a acumularse, hasta que,

coincidiendo con el pico de inducción de L-kinurenina tras la isquemia (a las 16 horas), el triptófano cerebral disminuye, retornando prácticamente a los niveles basales observados en los animales naïve.

Estos resultados sugieren que, tras la isquemia, de manera temprana y transitoria, el metabolismo del triptófano se encuentra alterado, produciéndose inicialmente una acumulación del mismo en el tejido isquémico, que de manera posterior será metabolizado en L-kinurenina. Dado que el pico de inducción de L-kinurenina se producía a las 16 horas, y los niveles de triptófano empezaban a disminuir entre las 5 y las 8 horas, realizamos una segunda serie de experimentos con una segunda administración del inhibidor de TDO a las 8 horas tras la oclusión. En este caso, la inhibición de la síntesis endógena de L-kinurenina redujo de manera espectacular el volumen de infarto.

Estos resultados son de notable importancia ya que, en principio, según la dinámica de crecimiento del infarto descrita por Saver (Saver, 2010), el *core* alcanza su máximo volumen entre las 3 y las 6 horas de evolución de la isquemia, por lo que cualquier intervención de tipo terapéutica debería producirse antes de ese tiempo, para evitar el reclutamiento de la penumbra a la zona del *core*. Sin embargo, nuestros resultados muestran un efecto más allá de esta ventana terapéutica. Puesto que la administración en dosis única 10' tras la pMCAO no mostró ningún efecto en el volumen del infarto, cabe esperar que una única dosis administrada las 8 horas tras la oclusión presentaría el mismo efecto neuroprotector en ausencia de la primera.

En cualquier caso, estas suposiciones deben ser comprobadas en futuros estudios encaminados a elucidar el mecanismo exacto de esta neuroprotección.

5.4 MECANISMOS PROMOVIDOS POR EL EJE L-KINURENINA - AHR EN MODELOS EXPERIMENTALES DE ICTUS ISQUÉMICO

5.4.1 Efecto en la entrada de Ca^{2+} mediada por una dosis tóxica de NMDA: Dependencia de AhR

Uno de los mecanismos más importantes que contribuye al daño mediado por la excesiva elevación de glutamato en el espacio extracelular es la sobreactivación de los receptores NMDA por este neurotransmisor y la subsiguiente entrada masiva de Ca^{2+} al interior neuronal. Una vez en el interior, el Ca^{2+} participa de manera activa en diferentes mecanismos que, en su conjunto, conducen a la muerte neuronal (Choi et al., 1988; Léveillé et al., 2008; Martin et al., 1998). Con el fin de caracterizar si la contribución de AhR al daño isquémico es en parte mediada por la entrada de Ca^{2+} al interior neuronal a través del receptor NMDA, evaluamos la respuesta al Ca^{2+} inducida por una dosis tóxica de NMDA tras la inhibición y/o activación de AhR en las neuronas corticales mediante el uso del antagonista de AhR TMF y el ligando L-Kyn. Nuestros resultados mostraron cómo, tras la inhibición de AhR mediante TMF, la concentración de Ca^{2+} en respuesta a NMDA se disminuye notablemente en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Apoyando estos resultados, la activación del receptor AhR por L-Kyn medió el efecto contrario. Este incremento resultó dependiente de AhR ya que el antagonista TMF revirtió el aumento mediado por L-Kyn.

Nuestros resultados confirman lo descrito previamente en la literatura para otros agonistas de AhR que se caracterizan por inducir un rápido incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular en diferentes tipos celulares (Dale y Eltom, 2006; Hanneman et al., 1996; Kim y Yang, 2005; Wong et al., 1997; Zhao et al., 2005). Aunque este incremento en la concentración de Ca^{2+} puede tener distintos orígenes, dependiendo del tipo celular y del agonista de AhR en cuestión, más

concretamente, cuando el tipo celular es neuronal, el incremento de la $[Ca^{2+}]$ es debido a los receptores NMDA (Kim y Yang, 2005; Lin et al., 2009).

En nuestros estudios hemos llevado a cabo diferentes análisis para determinar la contribución de otros factores al incremento en la $[Ca^{2+}]$ mediado por el agonista de AhR L-Kyn. El tratamiento con el agente despolarizante KCl a una alta concentración nos permitió determinar que las diferencias observadas no se debían a una diferente viabilidad neuronal a consecuencia del tratamiento, ni a una ruta independiente del receptor NMDA (Sattler et al., 1998). Esto también se confirmó con antagonistas específicos del receptor NMDA. Por un lado, utilizamos el antagonista competitivo D-AP5, el cual bloqueó selectivamente la respuesta del Ca^{2+} promovida por NMDA pero no por KCl. Además, aunque no ha sido mostrado en este estudio, el antagonista selectivo de los receptores de tipo NR2B RO-25-6981 bloqueó casi de manera total el incremento en la $[Ca^{2+}]$ inducida por NMDA, indicando que esta subunidad juega un papel fundamental en esta respuesta.

En base a estos resultados, podemos inferir que, en nuestro modelo, la activación de AhR promueve un incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular a través de los receptores NMDA.

5.4.2 Modulación de los receptores NMDA: Dependencia de AhR

Los antecedentes previos sobre el papel de la activación de AhR en procesos de excitotoxicidad apuntaban hacia una modulación directa de los receptores NMDA (Kim y Yang, 2005; Lin et al., 2008; 2009). Los estudios realizados por Lin y colaboradores (Lin et al., 2009) mostraban cómo la inhibición del receptor mediante siRNAs específicos inhibía a nivel transcripcional la expresión de la subunidad NR2A mientras que incrementaba la expresión de la subunidad NR2B. Entre los efectos finales observados, destacaban la producción de BDNF (Factor neurotrófico derivado del cerebro), sugiriendo una contribución del

receptor AhR en la modulación de la señal sináptica vs. extrasináptica que se traducía en neuroprotección cuando se inhibía al receptor.

Nuestros estudios de inhibición de AhR *in vitro* e *in vivo* no han conseguido replicar los resultados previamente publicados por este grupo. Ni la inhibición de AhR en los cultivos neuronales, ni la inhibición de AhR en modelos *in vivo*, que incluían la administración de TMF o los ratones heterocigotos, produjo cambios en los niveles de ARNm de las diferentes subunidades analizadas.

Para descartar que la ausencia de cambios de los receptores NMDA a nivel transcripcional no se debiese a una mala elección del tiempo en el cual se evaluó la expresión de los receptores (5 horas tras la OGD en los cultivos neuronales y 16 horas tras la isquemia cerebral en los experimentos *in vivo*), evaluamos los niveles proteicos totales de los receptores. Para este estudio, se utilizó el mismo diseño experimental que el usado para evaluar la respuesta en la $[Ca^{2+}]$ intracelular mediada por NMDA. En esta situación, sería de esperar que, si los cambios producidos en la $[Ca^{2+}]$ eran una consecuencia directa de alteraciones en los niveles totales de las diferentes subunidades del receptor NMDA, el pretratamiento durante 24h de las neuronas con TMF y/o L-Kyn, según lo realizado en el ensayo del Ca^{2+} , nos permitiría determinar esos cambios. Sin embargo, los estudios realizados no mostraron diferencias en los niveles totales de las diferentes subunidades *in vitro*. Por el contrario, los estudios realizados *in vivo* nos muestran que el tratamiento con TMF tras la isquemia incrementa los niveles totales de NR2A y NR2B en comparación con los animales tratados con vehículo. Este incremento en la expresión se acompañaba con una disminución del proceso de fragmentación al que están sometidos los receptores NMDA tras la isquemia (Gascón et al., 2008). Ya que la fragmentación de las subunidades NR2A y NR2B se correlaciona de manera directa con el volumen de infarto, tanto en los animales pMCAO tratados con vehículo como en los animales pMCAO tratados con TMF, la disminución

observada en la fragmentación proteolítica de las subunidades en los animales pMCAO TMF y, por ende, el incremento en su forma total no fragmentada, podría deberse simplemente al menor volumen de infarto observado en este grupo. Este proceso de fragmentación es dependiente de la activación por Ca^{2+} de la enzima calpaína (Guttmann et al., 2001; 2002; Szydlowska y Tymianski, 2010), por tanto, la menor entrada de Ca^{2+} mediada por la inhibición de AhR contribuiría a la menor degradación de los receptores. En base a esto, no podemos descartar que la reducción en el proceso de fragmentación sea un epifenómeno derivado de la neuroprotección mediada por la inhibición de AhR, en donde, un menor volumen de infarto lleva asociado una menor entrada de Ca^{2+} y, por tanto, una menor proteólisis dependiente de calpaína.

Nuestros resultados también muestran cómo la inhibición de AhR no sólo produce un incremento de los niveles totales de las subunidades NR2A y NR2B sino también, un incremento a nivel de la membrana neuronal. Estos resultados llamaron nuestra atención ya que, en principio, un aumento de los receptores NMDA en la superficie celular sería indicativo de la activación de un mayor número de receptores ante el exceso de glutamato. De hecho, varios estudios muestran que una reducción de los niveles de los receptores NMDA es neuroprotectora en modelos experimentales de isquemia cerebral (Harraz et al., 2012; Zhang et al., 2010b; 2013b), ya que en principio, un menor número de receptores supondría una menor activación de los mismos ante el estímulo excitotóxico. Pese a ello, nuestros resultados muestran que la inhibición *in vivo* e *in vitro* de AhR disminuye la muerte neuronal a través de un incremento en la expresión total en membrana de las subunidades NR2A y NR2B.

El funcionamiento del receptor NMDA y las consecuencias de su activación son dependientes de la localización exacta en la membrana neuronal (Chen et al., 2008; Guttmann et al., 2001; Hetman y Kharebava, 2006; Liu et al., 2007; Tu et al., 2010; Zhou et al., 2010), de tal forma que los receptores localizados en los

sitios sinápticos activan rutas de supervivencia mientras que los extrasinápticos desencadenan rutas asociadas a la muerte neuronal. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral podrían ser explicados por una diferente localización de los receptores en la membrana neuronal. En efecto, hemos demostrado, por primera vez, que la inhibición de AhR incrementa la localización sináptica de la subunidad NR2B, al mismo tiempo que disminuye la localización extrasináptica, mientras que la activación del receptor AhR por su agonista L-Kyn produce el efecto opuesto.

Los receptores NMDA sinápticos vs. extrasinápticos difieren a la hora de su activación. Mientras que los localizados a nivel sináptico son generalmente activados de manera intensa, pero transitoria, por la liberación trans-sináptica de glutamato, los receptores extrasinápticos se activan de manera crónica a consecuencia de elevados niveles de glutamato (Hardingham y Bading, 2002). En nuestro modelo de excitotoxicidad por NMDA, la concentración utilizada produce la activación de los receptores sinápticos y extrasinápticos. En este contexto, y dado que la activación de AhR por L-Kyn media un incremento en los receptores extrasinápticos de tipo NR1/NR2B vs los sinápticos, nuestros resultados sugieren que el incremento de la $[Ca^{2+}]$ intracelular observado tras la activación de AhR por su agonista L-Kyn es debido, de manera mayoritaria, a los receptores extrasinápticos.

De acuerdo con las evidencias que muestran el diferente papel de los receptores sinápticos y extrasinápticos en la regulación de CREB (Proteína de unión al elemento respuesta de AMP cíclico) (revisado en Hardingham y Bading, 2010; Hardingham et al., 2002; Léveillé et al., 2008; Xu et al., 2009), hemos demostrado que los cambios en la posición de los receptores en la membrana promovidos por el antagonista de AhR TMF median un incremento en la fosforilación del factor de transcripción CREB, potenciando por tanto rutas de supervivencia y bloqueando al mismo tiempo las señales de muerte inducidas por la entrada de

Ca²⁺ a través de los receptores extrasinápticos. Aunque no existen estudios que demuestren cambios en la localización en membrana de los receptores en respuesta a la isquemia cerebral, si que un estudio reciente muestra cómo, la sobreactivación de los receptores extrasinápticos, principalmente compuestos por la subunidad NR2B, media el reclutamiento de la quinasa DAPK1 (Proteína quinasa asociada a muerte 1), promoviendo de manera directa la muerte neuronal (Tu et al., 2010).

Nuestros resultados están totalmente de acuerdo con el modelo propuesto por el Dr. Hardingham (ver revisiones de Hardingham, 2009; Hardingham y Bading, 2010), en donde la hipofunción de los receptores sinápticos y/o la sobreactivación de los receptores extrasinápticos tendrían consecuencias devastadoras para la supervivencia neuronal. Aunque diversos estudios muestran una mayor contribución de la subunidad NR2B a los procesos de muerte (Chen et al., 2008; Liu et al., 2007; Zhang et al., 2013b), nuestros estudios muestran como su contribución a estos procesos es también dependiente de su localización en la membrana, de manera similar a lo observado por Tu y colaboradores (Tu et al., 2010), y por estudios previos que demuestran el papel fundamental de los receptores NR2B situados a nivel sináptico para los procesos de potenciación, plasticidad, memoria, aprendizaje y supervivencia (Gardoni et al., 2009; Léveillé et al., 2010; Martel et al., 2009).

En este punto, hemos de abordar una cuestión de tipo metodológico que hace referencia a la detección de los receptores de tipo NR2A. En nuestro modelo de cultivos neuronales, pese a que la edad del cultivo es de 14DIV, la subunidad mayoritaria es la de tipo NR2B. Los niveles de la subunidad NR2A son detectables a nivel total pero, a consecuencia del proceso de fraccionamiento, los niveles finalmente son tan reducidos, y las imágenes obtenidas tras el análisis mediante western blot de tan poca calidad, que es imposible la cuantificación de los niveles de la subunidad de NR2A con precisión. Es posible

que un incremento en el número de neuronas de partida, o bien, un mayor grado de madurez de las mismas (~21DIV), nos permitan determinar con precisión si la subunidad NR2A se encuentra sometida a un mecanismo similar de regulación. De todas formas, ya que la subunidad NR2A se localiza de manera preferente en los sitios sinápticos según lo descrito previamente en la literatura (Bard y Groc, 2011; Groc et al., 2006; 2009; Groc y Choquet, 2009), suponemos que, en nuestro modelo, su localización será mayoritariamente sináptica.

5.4.3 Modulación de las proteínas de anclaje MAGUKs: Dependencia de AhR

Ya que la familia de las proteínas MAGUKs (Guanilato quinasas asociadas a la membrana) participan en el reclutamiento, anclaje y posición de los receptores NMDA en la membrana (Kim y Sheng, 2004) quisimos evaluar si dos de sus principales miembros en el adulto, Sap102 (Proteína asociada a la sinapsis 102) y PSD95 (Densidad postsináptica 95) (Sans et al., 2003; 2005), eran las responsables de los cambios en la localización de la subunidad NR2B.

Nuestros resultados muestran que la administración del antagonista de AhR TMF tras la isquemia incrementa los niveles totales y de membrana de Sap102 en comparación con los animales pMCAO. Este efecto es específico para Sap102, ya que la expresión de PSD95, total y en membrana, fue similar en los animales pMCAO tratados con vehículo o TMF, ambos con una ligera reducción en comparación con el grupo de animales sham. Estos resultados fueron corroborados *in vitro*, observándose cómo el tratamiento con TMF incrementaba los niveles de Sap102, mientras que el agonista de AhR L-kinurena reducía dichos niveles en comparación con las neuronas tratadas con vehículo.

Sap102 es una proteína con una alta movilidad, capaz de desplazarse desde los sitios sinápticos a los extrasinápticos y viceversa (Chen et al., 2012a; Zheng et al., 2010). De hecho, aunque los datos no han sido mostrados en este estudio, nuestros resultados confirmaron lo previamente descrito por otros trabajos que han mostrado que la localización de PSD95 es mayoritariamente sináptica, mientras que la de Sap102 se encuentra repartida entre los sitios sinápticos y extrasinápticos. Puesto que además Sap102 interacciona de manera preferencial con la subunidad NR2B (Sans et al., 2000; 2005), confiriendo a esta subunidad una alta movilidad a lo largo de la membrana, nuestros resultados, sumados a los antecedentes comentados, apuntaban hacia Sap102 como la responsable en el cambio de localización de la subunidad NR2B dependiente de AhR.

Para confirmar si el cambio de localización de la subunidad NR2B era debido a su interacción con Sap102, realizamos una serie de experimentos de co-inmunoprecipitación de Sap102 y la subunidad NR2B. El análisis de los resultados obtenidos demostró que, tras la isquemia, la interacción de Sap102 con el receptor NR2B se ve drásticamente reducida, así como la interacción de Sap102 con PSD95. Sin embargo, la inhibición del receptor AhR mediante su antagonista TMF revirtió el efecto ocasionado por la isquemia, incrementando parcialmente la interacción de Sap102 con la subunidad NR2B y, de manera total, la interacción con la proteína PSD95. Las modificaciones observadas tras la isquemia en relación a Sap102 y el receptor NR2B se confirmaron mediante la co-inmunoprecipitación de NR2B (datos no mostrados en este estudio), observando resultados similares a los mostrados para Sap102.

La ausencia de interacción entre Sap102 y el receptor NR2B inducida por la isquemia nos sugiere una alteración en la arquitectura de la membrana postsináptica que debe influir de manera decisiva en el funcionamiento de los receptores NMDA. Desconocemos aún el mecanismo exacto a través del cual la ausencia de interacción de Sap102 con el receptor NR2B tras la isquemia

cerebral se traduce en cambios en la inserción y localización de los receptores en la membrana. La localización sináptica de los receptores de tipo NR2B está mediada por las interacciones con los dominios PDZ de las proteínas MAGUK. Esta interacción media el anclaje y estabilización del receptor a la membrana postsináptica en los sitios PSD (Densidad postsináptica) (Prybylowski et al., 2005), de tal forma que, cuando este tipo de interacciones se rompe, se promueve la difusión lateral de los receptores (Chen et al., 2012a; Zhang et al., 2008). Además, esta interacción es fundamental para los mecanismos de endocitosis y exocitosis del receptor (Rudinskiy et al., 2009; Sans et al., 2000; 2005) que contribuyen de manera decisiva a los niveles de membrana del receptor. A consecuencia de ello, la ausencia de interacción de la subunidad NR2B con Sap102 participa en la modulación de los niveles de la subunidad NR2B en los sitios sinápticos y extrasinápticos, y determina finalmente la función del receptor.

Resultados similares a los mostrados en nuestro estudio han sido descritos por el grupo de Gardoni (Gardoni et al., 2006) en el contexto de las disquinesias inducidas por L-DOPA en modelos animales de parkinsonismo. En este trabajo, los autores describen que la disminución de la interacción de Sap102 con la subunidad NR2B produce una redistribución de dicha subunidad desde los sitios sinápticos a los extrasinápticos. En otros contextos patológicos en los que el funcionamiento de los receptores NMDA se altera y contribuye de manera activa al daño como, por ejemplo, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer, la esquizofrenia y el trastorno bipolar, también se han detectado cambios en la proteína Sap102 así como cambios en la interacción de esta proteína con los receptores NMDA (Beneyto y Meador-Woodruff, 2008; Clinton et al., 2006; Fan et al., 2009; Proctor et al., 2010).

En el contexto de la isquemia cerebral, los estudios se han centrado, sobre todo, en la interacción del receptor NMDA con la proteína MAGUK PSD95. Tras

demostrarse cómo la interacción entre los receptores de tipo NR2B y la proteína PSD95 se disminuía drásticamente tras la isquemia (Takagi et al., 2000), se observó que PSD95 era capaz de reclutar a la enzima nNOS (Óxido nítrico sintasa neuronal) a la membrana la cual mediaría parte del daño tras el proceso isquémico (Cui et al., 2007; Aarts et al., 2002; Christopherson et al., 1999). Bloqueando la interacción entre PSD95 y nNOS se disminuye la excitotoxicidad y la muerte neuronal tras la isquemia cerebral (Cook et al., 2012; Zhou et al., 2010).

La implicación de Sap102 en estos procesos patológicos pone de manifiesto la importante función de esta proteína en el correcto funcionamiento de los receptores NMDA. De hecho, Sap102 es fundamental en el desarrollo cognitivo, en los procesos de aprendizaje, LTP (Potenciación a largo plazo) y memoria, contribuye a la formación de la morfología de las espinas dendríticas (Chen et al., 2011; 2012a; Cuthbert et al., 2007; Murata y Constantine-Paton, 2013; Zheng et al., 2010) e, incluso, diversas mutaciones sobre la misma se relacionan de manera directa con diversos tipos de retraso mental (Tarpey et al., 2004; Zanni et al., 2010).

Hasta la fecha, no se había establecido ninguna relación entre la proteína Sap102 y el receptor AhR. Nuestro estudio no sólo muestra que AhR es capaz de regular los niveles de Sap102 sino que, además, esta regulación se produce a través de un mecanismo que necesita de la interacción directa de Sap102 y AhR. Como muestran nuestros resultados, tras la isquemia se potencia la interacción entre el receptor AhR y la proteína Sap102, y esa interacción modifica drásticamente los niveles de Sap102. La interacción además requiere una traslocación del receptor AhR a la membrana plasmática, el cual, hasta la fecha, había sido descrito como un receptor citoplasmático en ausencia de ligando, y nuclear en presencia de un agonista. El tratamiento con el antagonista de AhR TMF produce una ligera reducción de los niveles del receptor asociado a la

membrana en comparación con el grupo de animales tratados con vehículo, o en los experimentos realizados en cultivos neuronales. Este hecho sugiere que, de igual forma que la traslocación al núcleo del receptor es un proceso dependiente de ligando, su traslocación a la membrana podría estar sometida al mismo tipo de regulación.

Está claro por tanto que, en este contexto, AhR no parece funcionar como un factor de transcripción. Su función nos recuerda más a su actividad E3 ubiquitina ligasa, en donde AhR actúa a modo de subunidad de reconocimiento del sustrato que será degradado por el proteasoma 26S (Ohtake et al., 2007). De hecho, uno de los principales mecanismos de regulación de la organización de la sinapsis neuronal está mediado por procesos de ubiquitinación y degradación por el proteasoma. Tanto es así, que el proceso de ubiquitinación es capaz de regular la transmisión sináptica, la LTP, la facilitación y el desarrollo de la sinapsis (DiAntonio et al., 2001; Hegde et al., 1997; Jiang et al., 1998; Wilson et al., 2002). En la sinapsis, tanto las diferentes subunidades de los receptores NMDA, como las proteínas de anclaje MAGUKs, se encuentran sometidas a un estricto proceso de regulación diferencial por el proteasoma que es dependiente de la actividad neuronal (Lau y Zukin, 2007). El exhaustivo estudio realizado por Ehlers (Ehlers, 2003) describe de manera pormenorizada cómo, en respuesta a un incremento en la actividad, las proteínas postsinápticas sufren un proceso de ubiquitinación que desestabiliza la densidad postsináptica, alterando los complejos multiproteicos y las rutas de señalización acopladas de la membrana postsináptica. Entre las proteínas afectadas por esta degradación ante una actividad crónica se encuentra Sap102.

Es posible que, en este contexto y de manera similar a lo observado para el receptor de estrógenos, el receptor de andrógenos y la β -catenina (Kawajiri et al., 2009; Ohtake et al., 2007), AhR participe en la degradación de la proteína Sap102, incrementando su degradación a consecuencia del proceso isquémico,

modificando la arquitectura de la sinapsis y contribuyendo finalmente al daño neuronal. Futuras investigaciones nos permitirán desentrañar el mecanismo concreto de regulación de AhR sobre la proteína Sap102.

5.4.4 Modulación de la ruta promovida por CREB: Dependencia de AhR

El factor de transcripción CREB juega un papel fundamental en la supervivencia neuronal a través de la regulación de los genes *AIDs* (Inhibidores de la muerte regulados por actividad) y la neurotrofina BDNF (Lau y Bading, 2009; Léveillé et al., 2010; Zhang et al., 2007; 2009). Nuestros resultados ponen de manifiesto que la modulación del receptor AhR afecta al factor de transcripción CREB a distintos niveles: primero, la inhibición de AhR mediante su antagonista TMF en modelos *in vivo* e *in vitro* es capaz de potenciar la fosforilación del factor de transcripción CREB a través de la inhibición y/o activación de los receptores extrasinápticos y sinápticos, respectivamente, pero además, en segundo lugar, la activación de AhR modula la actividad transcripcional de CREB mediante la formación de complejos AhR/CBP/CREB *in vitro* e *in vivo*. El secuestro de CREB y su co-activador CBP (Proteína de unión a CREB) por el receptor AhR en el núcleo se traduce en una disminución de la actividad transcripcional de CREB y, por tanto, en una disminución de las rutas de supervivencia promovidas por el mismo.

Como comentábamos, una de las principales dianas de la ruta de supervivencia promovida por CREB es la neurotrofina BDNF. Este factor es fundamental para el correcto desarrollo del SNC (Cohen-Cory et al., 2010) y se ha implicado en la inducción de la LTP, así como en procesos de aprendizaje y memoria (Greenberg et al., 2009; Nagappan y Lu, 2005). Esta neurotrofina no solo desempeña un papel fundamental a nivel fisiológico sino que, además, se encuentra implicada en procesos de neurorreparación en patologías del SNC.

De hecho, tras la isquemia cerebral, la expresión de BDNF se incrementa en la zona lesionada y en las zonas cercanas a la lesión (Kokaia et al., 1998; Madinier et al., 2009; Sulejczak et al., 2007), y su expresión a largo plazo resulta fundamental para los procesos de reparación y plasticidad en el ictus isquémico (Cowansage et al.; Lipsky y Marini, 2007; Mattson, 2008).

Nuestro estudio muestra que la inhibición de AhR mediante su antagonista TMF es capaz de aumentar los niveles de BDNF *in vitro* e *in vivo*. De hecho, en las neuronas corticales, la inhibición de AhR produce un incremento en los niveles de ARNm de BDNF, mientras que la activación de AhR por su agonista L-Kyn mostró una tendencia contraria. Un comportamiento similar se observa para otro de los genes diana de CREB, el gen NPAS4 (Proteína PAS neuronal 4), confirmando por tanto que el incremento de los complejos AhR/CBP/CREB promovido por la activación del receptor AhR mediante L-Kyn tiene como efecto final una menor supervivencia neuronal. En nuestro modelo *in vivo*, la inhibición de AhR mediante TMF en animales sham incrementa la concentración cerebral de BDNF. Sin embargo, al evaluar la concentración en el cerebro isquémico, los animales tratados con vehículo presentaban niveles superiores de BDNF que los tratados con el antagonista de AhR TMF. El incremento observado en los animales pMCAO tratados con vehículo mostró una clara correlación con el volumen de infarto, lo que sugería que la producción de BDNF se incrementaba con el daño isquémico. De hecho, existen estudios previos que muestran que la inducción de BDNF es proporcional al daño (Béjot et al., 2011; Comelli et al., 1992; Kokaia et al., 1995; Rickhag et al., 2007; Zhao et al., 2000). Por este motivo, con el fin de eliminar el incremento asociado al daño, se procedió a normalizar los niveles de BDNF por el volumen de infarto, tras lo cual se observa claramente que, de manera similar a lo mostrado para los animales sham tratados con el antagonista de AhR, los animales pMCAO tratados con TMF incrementaban significativamente la

concentración cerebral de BDNF en comparación con los tratados con vehículo. Los resultados obtenidos en relación a BDNF están de acuerdo con los datos de la literatura (Kim y Yang, 2005; Lin et al., 2008; 2009), en donde la activación de AhR disminuía la interacción de CBP con los elementos respuesta de CREB y, como consecuencia, los niveles de BDNF.

El incremento en la actividad transcripcional de CREB al inhibir al receptor AhR mediante su antagonista TMF se acompañó también por una disminución de los niveles de p53 y de la proteína pro-apoptótica Puma (Modulador de la apoptosis regulado por P53), así como por un incremento de la proteína anti-apoptótica bcl-x (*B cell lymphoma X*). Todas estas proteínas han sido identificadas como dianas de la actividad de los receptores sinápticos (ver revisiones de Hardingham, 2009; Hardingham y Bading, 2010).

Todos estos resultados, en su conjunto, refuerzan el papel del receptor AhR en la modulación de la señal promovida por los receptores NMDA sinápticos y extrasinápticos, así como, en la señalización intracelular desencadenada por la activación de los mismos.

5.4.5 Función fisiológica de AhR en el cerebro: Futuros estudios

Los resultados mostrados en esta Tesis doctoral ponen de manifiesto el relevante papel de AhR en el contexto de la isquemia cerebral, en donde su activación por L-Kyn en la región lesionada resulta deletérea en la fase aguda del ictus isquémico. Este daño es dependiente de la modulación de los receptores NMDA y la proteína MAGUK Sap102. Pero además, la expresión neuronal del receptor AhR en los animales sham así como en regiones remotas alejadas de la zona infartada en los animales isquémicos nos sugiere un posible papel de AhR en la fisiología neuronal y en los procesos de neuroreparación que tienen lugar a tiempos más tardíos tras la isquemia cerebral. De hecho, uno de los procesos fundamentales en la recuperación funcional tras la isquemia es

la plasticidad sináptica. Este proceso de plasticidad es de vital importancia para la reorganización de los circuitos neuronales y la remodelación dendrítica que se produce tras un ictus isquémico, ya que las regiones remotas asumen la función de la zona lesionada disminuyendo el déficit neurológico y las secuelas en los pacientes afectados por un ictus isquémico. En este contexto, la transmisión glutamatérgica y en especial, la mediada por la activación de los receptores NMDA es una pieza clave de la plasticidad sináptica en situaciones fisiológicas y/o patológicas, siendo además imprescindible para procesos de potenciación, memoria, aprendizaje y supervivencia (Chen et al., 2011; 2012a; Cuthbert et al., 2007; Gardoni et al., 2009; Léveillé et al., 2010; Martel et al., 2009).

Dado que tras la isquemia, AhR es capaz de modular al receptor NMDA a diferentes niveles modificando su activación y función, es probable que la activación de AhR en el cerebro normal o en regiones remotas en respuesta a la isquemia participe de igual forma en un mecanismo de regulación del receptor NMDA similar al observado en la zona lesionada. El papel de AhR en este contexto será explorado en futuros estudios encaminados a determinar si, en una condición fisiológica, la activación del receptor AhR participa en la homeostasis cerebral y de igual forma si, ante una situación patológica como el ictus isquémico, la activación del receptor AhR participaría en los procesos de plasticidad y neuroreparación que contribuyen a largo plazo a la mejora funcional.

The background of the slide is a light beige color with a complex, organic marbled pattern in shades of brown and tan. A large, semi-transparent white number '6' is centered on the slide, serving as a background for the text.

CONCLUSIONES

1. El receptor AhR (receptor para hidrocarburos de arilo) se localiza en neuronas en el cerebro de ratón y en cultivos de neuronas de rata.
2. La isquemia cerebral experimental induce un aumento de la expresión de AhR, así como su traslocación al núcleo y su actividad transcripcional.
3. La inhibición del receptor AhR en isquemia cerebral experimental en ratón y rata es neuroprotectora.
4. La isquemia cerebral experimental incrementa los niveles plasmáticos y cerebrales de L-triptófano y del agonista de AhR L-kinurenina, así como de la expresión de la enzima TDO.
5. Tras isquemia cerebral experimental, L-kinurenina induce la traslocación al núcleo del receptor AhR así como la expresión de sus genes diana Cyp1a1 y Cyp1b1.
6. La administración exógena de L-kinurenina incrementa el daño en diferentes modelos de excitotoxicidad *in vitro* pero no en modelos de isquemia cerebral *in vivo*. El efecto es parcialmente AhR dependiente.
7. Tras la isquemia cerebral experimental, la inhibición de la enzima TDO disminuye la traslocación al núcleo de AhR así como la expresión de su gen diana Cyp1b1, y es neuroprotectora.
8. La exposición al agonista de AhR L-kinurenina incrementa la concentración de Ca^{2+} inducida por una dosis tóxica de NMDA. Este efecto es parcialmente AhR dependiente.

9. El antagonista de AhR TMF incrementa la expresión en membrana de NR2B y su localización sináptica, disminuye la extrasináptica, al mismo tiempo que media un aumento en la fosforilación de CREB.
10. La isquemia cerebral experimental reduce los niveles totales y en membrana de Sap102, así como su interacción con la subunidad NR2B y la proteína PSD95. Este efecto es parcialmente dependiente de AhR.
11. AhR interacciona en la membrana con Sap102 y en el núcleo con el factor de transcripción CREB y CBP. Esta última interacción disminuye los niveles de BDNF.
12. La vía L-kinurenina-AhR es una prometedora diana para futuras intervenciones terapéuticas en el tratamiento del ictus isquémico.



REFERENCIAS

(1983). Incidence of stroke in Oxfordshire: first year's experience of a community stroke register. *Br Med J (Clin Res Ed)* 287, 713-717.

(1990). Special report from the National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Classification of cerebrovascular diseases III. *Stroke* 21, 637-676.

(1995). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* 333, 1581-1587.

A

Aarts, M., Liu, Y., Liu, L., Besshoh, S., Arundine, M., Gurd, J.W., Wang, Y.T., Salter, M.W., and Tymianski, M. (2002). Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor- PSD-95 protein interactions. *Science* 298, 846-850.

Abbott, B.D., Birnbaum, L.S., and Perdew, G.H. (1995). Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse embryo. *Dev Dyn* 204, 133-143.

Abbott, B.D., and Probst, M.R. (1995). Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: II. Expression of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in the C57BL/6N mouse embryo. *Dev Dyn* 204, 144-155.

Abbott, B.D., Schmid, J.E., Pitt, J.A., Buckalew, A.R., Wood, C.R., Held, G.A., and Diliberto, J.J. (1999). Adverse reproductive outcomes in the transgenic Ah receptor-deficient mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 155, 62-70.

Abumiya, T., Lucero, J., Heo, J.H., Tagaya, M., Koziol, J.A., Copeland, B.R., and del Zoppo, G.J. (1999). Activated microvessels express vascular endothelial growth factor and integrin alpha(v)beta3 during focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 1038-1050.

Adams, H.P., Bendixen, B.H., Kappelle, L.J., Biller, J., Love, B.B., Gordon, D.L., and Marsh, E.E. (1993). Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 24, 35-41.

Adams, S., Braid, N., Bessede, A., Brew, B.J., Grant, R., Teo, C., and Guillemin, G.J. (2012). The kynurenine pathway in brain tumor pathogenesis. *Cancer Res* 72, 5649-5657.

Al-Hallaq, R.A., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., and Wenthold, R.J. (2007). NMDA di-heteromeric receptor populations and associated proteins in rat hippocampus. *J Neurosci* 27, 8334-8343.

Al-Mubarak, B., Soriano, F.X., and Hardingham, G.E. (2009). Synaptic NMDAR activity suppresses FOXO1 expression via a cis-acting FOXO binding site: FOXO1 is a FOXO target gene. *Channels (Austin)* 3, 233-238.

Albers, G.W., Goldstein, L.B., Hess, D.C., Wechsler, L.R., Furie, K.L., Gorelick, P.B., Hurn, P., Liebeskind, D.S., Nogueira, R.G., Saver, J.L., et al. (2011). Stroke Treatment Academic Industry Roundtable (STAIR) recommendations for maximizing the use of intravenous thrombolytics and expanding treatment options with intra-arterial and neuroprotective therapies. *Stroke* 42, 2645-2650.

Allison, D.W., Gelfand, V.I., Spector, I., and Craig, A.M. (1998). Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors. *J Neurosci* 18, 2423-2436.

Alvarez Sabín, J., Alonso de Leciana, M., Gállego, J., Gil-Peralta, A., Casado, I., Castillo, J., Díez Tejedor, E., Gil, A., Jiménez, C., Lago, A., et al. (2006). [Plan for stroke healthcare delivery]. *Neurología* 21, 717-726.

Amarenco, P., Bogousslavsky, J., Caplan, L.R., Donnan, G.A., and Hennerici, M.G. (2009a). Classification of stroke subtypes. *Cerebrovasc Dis* 27, 493-501.

Amarenco, P., Bogousslavsky, J., Caplan, L.R., Donnan, G.A., and Hennerici, M.G. (2009b). New approach to stroke subtyping: the A-S-C-O (phenotypic) classification of stroke. *Cerebrovasc Dis* 27, 502-508.

Ames, A., Wright, R.L., Kowada, M., Thurston, J.M., and Majno, G. (1968). Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol* 52, 437-453.

Arany, Z., Huang, L.E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M.A., Bunn, H.F., and Livingston, D.M. (1996). An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12969-12973.

Astrup, J., Siesjö, B.K., and Symon, L. (1981). Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12, 723-725.

B

Baba, T., Mimura, J., Gradin, K., Kuroiwa, A., Watanabe, T., Matsuda, Y., Inazawa, J., Sogawa, K., and Fujii-Kuriyama, Y. (2001). Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *J Biol Chem* 276, 33101-33110.

Baba, T., Mimura, J., Nakamura, N., Harada, N., Yamamoto, M., Morohashi, K., and Fujii-Kuriyama, Y. (2005). Intrinsic function of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor as a key factor in female reproduction. *Mol Cell Biol* 25, 10040-10051.

Backlund, M., and Ingelman-Sundberg, M. (2005). Regulation of aryl hydrocarbon receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Cell Signal* 17, 39-48.

Bading, H., Ginty, D.D., and Greenberg, M.E. (1993). Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science* 260, 181-186.

Bandiera, S., Safe, S., and Okey, A.B. (1982). Binding of polychlorinated biphenyls classified as either phenobarbitone-, 3-methylcholanthrene- or mixed-type inducers to cytosolic Ah receptor. *Chem Biol Interact* 39, 259-277.

Bard, L., and Groc, L. (2011). Glutamate receptor dynamics and protein interaction: lessons from the NMDA receptor. *Mol Cell Neurosci* 48, 298-307.

Bard, L., Sainlos, M., Bouchet, D., Cousins, S., Mikasova, L., Breillat, C., Stephenson, F.A., Imperiali, B., Choquet, D., and Groc, L. (2010). Dynamic and specific interaction between synaptic NR2-NMDA receptor and PDZ proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 19561-19566.

Barouki, R., Aggerbeck, M., Aggerbeck, L., and Coumoul, X. (2012). The aryl hydrocarbon receptor system. *Drug Metabol Drug Interact* 27, 3-8.

Barouki, R., Coumoul, X., and Fernández-Salguero, P.M. (2007). The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett* 581, 3608-3615.

Barron, M.G., Heintz, R., and Rice, S.D. (2004). Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish. *Mar Environ Res* 58, 95-100.

Bayer, K.U., De Koninck, P., Leonard, A.S., Hell, J.W., and Schulman, H. (2001). Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. *Nature* 411, 801-805.

Beckman, J.S., and Koppenol, W.H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271, C1424-1437.

Bederson, J.B., Pitts, L.H., Germano, S.M., Nishimura, M.C., Davis, R.L., and Bartkowski, H.M. (1986). Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 17, 1304-1308.

Behan, W.M., and Stone, T.W. (2000). Role of kynurenines in the neurotoxic actions of kainic acid. *Br J Pharmacol* 129, 1764-1770.

Beischlag, T.V., Luis Morales, J., Hollingshead, B.D., and Perdew, G.H. (2008). The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 18, 207-250.

Beischlag, T.V., Wang, S., Rose, D.W., Torchia, J., Reisz-Porszasz, S., Muhammad, K., Nelson, W.E., Probst, M.R., Rosenfeld, M.G., and Hankinson, O. (2002). Recruitment of the NCoA/SRC-1/p160 family of transcriptional coactivators by the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator complex. *Mol Cell Biol* 22, 4319-4333.

Bell, K.F., Bent, R.J., Meese-Tamuri, S., Ali, A., Forder, J.P., and Aarts, M.M. (2013). Calmodulin Kinase IV-dependent CREB activation is required for neuroprotection via NMDA receptor-PSD95 disruption. *J Neurochem*.

Beneyto, M., and Meador-Woodruff, J.H. (2008). Lamina-specific abnormalities of NMDA receptor-associated postsynaptic protein transcripts in the prefrontal cortex

in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 33, 2175-2186.

Berg, P., and Pongratz, I. (2002). Two parallel pathways mediate cytoplasmic localization of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem* 277, 32310-32319.

Bertazzo, A., Ragazzi, E., Biasiolo, M., Costa, C.V., and Allegri, G. (2001). Enzyme activities involved in tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in rabbits. *Biochim Biophys Acta* 1527, 167-175.

Bock, K.W., and Köhle, C. (2006). Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochem Pharmacol* 72, 393-404.

Brooks, S.P., and Dunnett, S.B. (2009). Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci* 10, 519-529.

Brouns, R., and De Deyn, P.P. (2009). The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg* 111, 483-495.

Butler, R.A., Kelley, M.L., Powell, W.H., Hahn, M.E., and Van Beneden, R.J. (2001). An aryl hydrocarbon receptor (AHR) homologue from the soft-shell clam, *Mya arenaria*: evidence that invertebrate AHR homologues lack 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and beta-naphthoflavone binding. *Gene* 278, 223-234.

Béjot, Y., Prigent-Tessier, A., Cachia, C., Giroud, M., Mossiat, C., Bertrand, N., Garnier, P., and Marie, C. (2011). Time-dependent contribution of non neuronal cells to BDNF production after ischemic stroke in rats. *Neurochem Int* 58, 102-111.

C

Campbell, S.J., Henderson, C.J., Anthony, D.C., Davidson, D., Clark, A.J., and Wolf, C.R. (2005). The murine Cyp1a1 gene is expressed in a restricted spatial and temporal pattern during embryonic development. *J Biol Chem* 280, 5828-5835.

Cardona, A.E., Pioro, E.P., Sasse, M.E., Kostenko, V., Cardona, S.M., Dijkstra, I.M., Huang, D., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R., et al. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci* 9, 917-924.

Carlin, J.M., Ozaki, Y., Byrne, G.I., Brown, R.R., and Borden, E.C. (1989). Interferons and indoleamine 2,3-dioxygenase: role in antimicrobial and antitumor effects. *Experientia* 45, 535-541.

Carver, L.A., and Bradfield, C.A. (1997). Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J Biol Chem* 272, 11452-11456.

Chandler, L.J., Sutton, G., Dorairaj, N.R., and Norwood, D. (2001). N-methyl D-aspartate receptor-mediated bidirectional control of extracellular signal-regulated kinase activity in cortical neuronal cultures. *J Biol Chem* 276, 2627-2636.

Chang, C., Smith, D.R., Prasad, V.S., Sidman, C.L., Nebert, D.W., and Puga, A. (1993). Ten nucleotide differences, five of which cause amino acid changes, are associated with the Ah receptor locus polymorphism of C57BL/6 and DBA/2 mice. *Pharmacogenetics* 3, 312-321.

Chatterton, J.E., Awobuluyi, M., Premkumar, L.S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K.A., Nakanishi, N., et al. (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415, 793-798.

Chen, B.S., Gray, J.A., Sanz-Clemente, A., Wei, Z., Thomas, E.V., Nicoll, R.A., and Roche, K.W. (2012a). SAP102 mediates synaptic clearance of NMDA receptors. *Cell Rep* 2, 1120-1128.

Chen, B.S., and Roche, K.W. (2007). Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. *Neuropharmacology* 53, 362-368.

Chen, B.S., Thomas, E.V., Sanz-Clemente, A., and Roche, K.W. (2011). NMDA receptor-dependent regulation of dendritic spine morphology by SAP102 splice variants. *J Neurosci* 31, 89-96.

Chen, J., Sanberg, P.R., Li, Y., Wang, L., Lu, M., Willing, A.E., Sanchez-Ramos, J., and Chopp, M. (2001). Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* 32, 2682-2688.

Chen, M., Lu, T.J., Chen, X.J., Zhou, Y., Chen, Q., Feng, X.Y., Xu, L., Duan, W.H.,

- and Xiong, Z.Q. (2008). Differential roles of NMDA receptor subtypes in ischemic neuronal cell death and ischemic tolerance. *Stroke* 39, 3042-3048.
- Chen, P.H., Gao, S., Wang, Y.J., Xu, A.D., Li, Y.S., and Wang, D. (2012b). Classifying Ischemic Stroke, from TOAST to CISS. *CNS Neurosci Ther* 18, 452-456.
- Chen, S., Operaña, T., Bonzo, J., Nguyen, N., and Tukey, R.H. (2005). ERK kinase inhibition stabilizes the aryl hydrocarbon receptor: implications for transcriptional activation and protein degradation. *J Biol Chem* 280, 4350-4359.
- Chen, S.T., Hsu, C.Y., Hogan, E.L., Maricq, H., and Balentine, J.D. (1986). A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 17, 738-743.
- Chen, Y.H., and Tukey, R.H. (1996). Protein kinase C modulates regulation of the CYP1A1 gene by the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 271, 26261-26266.
- Chevallier, A., Mialot, A., Petit, J.M., Fernández-Salguero, P., Barouki, R., Coumoul, X., and Beranek, M. (2013). Oculomotor deficits in aryl hydrocarbon receptor null mouse. *PLoS One* 8, e53520.
- Cho, Y.C., Zheng, W., and Jefcoate, C.R. (2004). Disruption of cell-cell contact maximally but transiently activates AhR-mediated transcription in 10T1/2 fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol* 199, 220-238.
- Choi, D.W. (1987). Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7, 369-379.
- Choi, D.W. (1988a). Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11, 465-469.
- Choi, D.W. (1988b). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1, 623-634.
- Choi, D.W. (1996). Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol* 6, 667-672.
- Choi, D.W. (2005). Neurodegeneration: cellular defences destroyed. *Nature* 433, 696-698.
- Choi, D.W., Koh, J.Y., and Peters, S. (1988). Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci* 8, 185-196.
- Choi, E.Y., Lee, H., Dingle, R.W., Kim, K.B., and Swanson, H.I. (2012). Development of novel CH223191-based antagonists of the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol* 81, 3-11.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
- Choudhary, D., Jansson, I., Schenkman, J.B., Sarfarazi, M., and Stoilov, I. (2003). Comparative expression profiling of 40 mouse cytochrome P450 genes in embryonic and adult tissues. *Arch Biochem Biophys* 414, 91-100.
- Christopherson, K.S., Hillier, B.J., Lim, W.A., and Bredt, D.S. (1999). PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem* 274, 27467-27473.
- Chrivia, J.C., Kwok, R.P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M.R., and Goodman, R.H. (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365, 855-859.
- Chung, K.T., and Gadupudi, G.S. (2011). Possible roles of excess tryptophan metabolites in cancer. *Environ Mol Mutagen* 52, 81-104.
- Ciolino, H.P., Daschner, P.J., and Yeh, G.C. (1999). Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem J* 340 (Pt 3), 715-722.
- Clinton, S.M., Haroutunian, V., and Meador-Woodruff, J.H. (2006). Up-regulation of NMDA receptor subunit and post-synaptic density protein expression in the thalamus of elderly patients with schizophrenia. *J Neurochem* 98, 1114-1125.
- Cohen, J.E., Itshayek, E., Moskovici, S., Gomori, J.M., Fraifeld, S., Eichel, R., and Leker, R.R. (2011). State-of-the-art reperfusion strategies for acute ischemic stroke. *J Clin Neurosci* 18, 319-323.
- Cohen-Cory, S., Kidane, A.H., Shirkey, N.J., and Marshak, S. (2010). Brain-derived

neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. *Dev Neurobiol* 70, 271-288.

Collins, L.L., Williamson, M.A., Thompson, B.D., Dever, D.P., Gasiewicz, T.A., and Opanashuk, L.A. (2008). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure disrupts granule neuron precursor maturation in the developing mouse cerebellum. *Toxicol Sci* 103, 125-136.

Comelli, M.C., Seren, M.S., Guidolin, D., Manev, R.M., Favaron, M., Rimland, J.M., Canella, R., Negro, A., and Manev, H. (1992). Photochemical stroke and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression. *Neuroreport* 3, 473-476.

Committee, E.S.O.E.E., and Committee, E.W. (2008). Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. *Cerebrovasc Dis* 25, 457-507.

Conn, P.J. (2003). Physiological roles and therapeutic potential of metabotropic glutamate receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1003, 12-21.

Conn, P.J., and Pin, J.P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37, 205-237.

Conney, A.H. (1982). Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res* 42, 4875-4917.

Cook, D.J., Teves, L., and Tymianski, M. (2012). Treatment of stroke with a PSD-95 inhibitor in the gyrencephalic primate brain. *Nature* 483, 213-217.

Cowansage, K.K., LeDoux, J.E., and Monfils, M.H. Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. *Current molecular pharmacology* 3, 12-29.

Crews, S.T., and Fan, C.M. (1999). Remembrance of things PAS: regulation of development by bHLH-PAS proteins. *Curr Opin Genet Dev* 9, 580-587.

Cui, H., Hayashi, A., Sun, H.S., Belmares, M.P., Cobey, C., Phan, T., Schweizer, J., Salter, M.W., Wang, Y.T., Tasker, R.A., et al. (2007). PDZ protein interactions underlying NMDA receptor-mediated

excitotoxicity and neuroprotection by PSD-95 inhibitors. *J Neurosci* 27, 9901-9915.

Cuthbert, P.C., Stanford, L.E., Coba, M.P., Ainge, J.A., Fink, A.E., Opazo, P., Delgado, J.Y., Komiyama, N.H., O'Dell, T.J., and Grant, S.G. (2007). Synapse-associated protein 102/dlg3 couples the NMDA receptor to specific plasticity pathways and learning strategies. *J Neurosci* 27, 2673-2682.

D

Dale, Y.R., and Eltom, S.E. (2006). Calpain mediates the dioxin-induced activation and down-regulation of the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol* 70, 1481-1487.

Darlington, L.G., Mackay, G.M., Forrest, C.M., Stoy, N., George, C., and Stone, T.W. (2007). Altered kynurenine metabolism correlates with infarct volume in stroke. *Eur J Neurosci* 26, 2211-2221.

Davarinos, N.A., and Pollenz, R.S. (1999). Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J Biol Chem* 274, 28708-28715.

De Cristóbal, J., Cárdenas, A., Lizasoain, I., Leza, J.C., Fernández-Tomé, P., Lorenzo, P., and Moro, M.A. (2002). Inhibition of glutamate release via recovery of ATP levels accounts for a neuroprotective effect of aspirin in rat cortical neurons exposed to oxygen-glucose deprivation. *Stroke* 33, 261-267.

del Zoppo, G.J. (2004). TIAs and the pathology of cerebral ischemia. *Neurology* 62, S15-19.

Denes, A., Thornton, P., Rothwell, N.J., and Allan, S.M. (2010). Inflammation and brain injury: acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation. *Brain Behav Immun* 24, 708-723.

Denis, M., Cuthill, S., Wikström, A.C., Poellinger, L., and Gustafsson, J.A. (1988). Association of the dioxin receptor with the Mr 90,000 heat shock protein: a structural kinship with the glucocorticoid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 155, 801-807.

Denison, M.S., Fisher, J.M., and Whitlock, J.P. (1988). The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. *Nucleotide*

sequence and functional analysis. *J Biol Chem* 263, 17221-17224.

DiAntonio, A., Haghighi, A.P., Portman, S.L., Lee, J.D., Amaranto, A.M., and Goodman, C.S. (2001). Ubiquitination-dependent mechanisms regulate synaptic growth and function. *Nature* 412, 449-452.

Dick, O., and Bading, H. (2010). Synaptic activity and nuclear calcium signaling protect hippocampal neurons from death signal-associated nuclear translocation of FoxO3a induced by extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 285, 19354-19361.

Díez-Tejedor, E., del Brutto, O., Alvarez Sabín, J., Muñoz, M., Abiusi, G., and Cerebrovasculares, S.I.d.E. (2001). [Classification of the cerebrovascular diseases. Iberoamerican Cerebrovascular diseases Society]. *Rev Neurol* 33, 455-464.

DiNatale, B.C., Murray, I.A., Schroeder, J.C., Flaveny, C.A., Lahoti, T.S., Laurenzana, E.M., Omiecinski, C.J., and Perdew, G.H. (2010). Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. *Toxicol Sci* 115, 89-97.

DiNatale, B.C., Schroeder, J.C., and Perdew, G.H. (2011). Ah receptor antagonism inhibits constitutive and cytokine inducible IL6 production in head and neck tumor cell lines. *Mol Carcinog* 50, 173-183.

DiNatale, B.C., Smith, K., John, K., Krishnegowda, G., Amin, S.G., and Perdew, G.H. (2012). Ah receptor antagonism represses head and neck tumor cell aggressive phenotype. *Mol Cancer Res* 10, 1369-1379.

Dirnagl, U., Iadecola, C., and Moskowitz, M.A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22, 391-397.

Dong, X.X., Wang, Y., and Qin, Z.H. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin* 30, 379-387.

Donnan, G.A., Fisher, M., Macleod, M., and Davis, S.M. (2008). Stroke. *Lancet* 371, 1612-1623.

Durukan, A., and Tatlisumak, T. (2007). Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* 87, 179-197.

E

Ehlers, M.D. (2003). Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci* 6, 231-242.

El-Husseini, A.E., Schnell, E., Chetkovich, D.M., Nicoll, R.A., and Bredt, D.S. (2000). PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* 290, 1364-1368.

Elferink, C.J., Ge, N.L., and Levine, A. (2001). Maximal aryl hydrocarbon receptor activity depends on an interaction with the retinoblastoma protein. *Mol Pharmacol* 59, 664-673.

Elias, G.M., and Nicoll, R.A. (2007). Synaptic trafficking of glutamate receptors by MAGUK scaffolding proteins. *Trends Cell Biol* 17, 343-352.

Emmons, R.B., Duncan, D., Estes, P.A., Kiefel, P., Mosher, J.T., Sonnenfeld, M., Ward, M.P., Duncan, I., and Crews, S.T. (1999). The spineless-aristopedia and tango bHLH-PAS proteins interact to control antennal and tarsal development in *Drosophila*. *Development* 126, 3937-3945.

Erreger, K., Dravid, S.M., Banke, T.G., Wyllie, D.J., and Traynelis, S.F. (2005). Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. *J Physiol* 563, 345-358.

Esser, C. (2009). The immune phenotype of AhR null mouse mutants: not a simple mirror of xenobiotic receptor over-activation. *Biochem Pharmacol* 77, 597-607.

Esser, C., Rannug, A., and Stockinger, B. (2009). The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends Immunol* 30, 447-454.

Evans, M.D., and Cooke, M.S. (2004). Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bioessays* 26, 533-542.

F

- Fame, R.M., MacDonald, J.L., and Macklis, J.D. (2011).** Development, specification, and diversity of callosal projection neurons. *Trends Neurosci* 34, 41-50.
- Fan, J., Cowan, C.M., Zhang, L.Y., Hayden, M.R., and Raymond, L.A. (2009).** Interaction of postsynaptic density protein-95 with NMDA receptors influences excitotoxicity in the yeast artificial chromosome mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 29, 10928-10938.
- Favaron, M., Manev, R.M., Rimland, J.M., Candeo, P., Beccaro, M., and Manev, H. (1993).** NMDA-stimulated expression of BDNF mRNA in cultured cerebellar granule neurones. *Neuroreport* 4, 1171-1174.
- Fernández-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D.M., McPhail, T., Lee, S.S., Kimura, S., Nebert, D.W., Rudikoff, S., Ward, J.M., and Gonzalez, F.J. (1995).** Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268, 722-726.
- Fernández-Salguero, P.M., Hilbert, D.M., Rudikoff, S., Ward, J.M., and Gonzalez, F.J. (1996).** Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 140, 173-179.
- Fernández-Salguero, P.M., Ward, J.M., Sundberg, J.P., and Gonzalez, F.J. (1997).** Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice. *Vet Pathol* 34, 605-614.
- Ferrario, C.R., Loweth, J.A., Milovanovic, M., Wang, X., and Wolf, M.E. (2011).** Distribution of AMPA receptor subunits and TARPs in synaptic and extrasynaptic membranes of the adult rat nucleus accumbens. *Neurosci Lett* 490, 180-184.
- Filbrandt, C.R., Wu, Z., Zlokovic, B., Opanashuk, L., and Gasiewicz, T.A. (2004).** Presence and functional activity of the aryl hydrocarbon receptor in isolated murine cerebral vascular endothelial cells and astrocytes. *Neurotoxicology* 25, 605-616.
- Fisher, M., Feuerstein, G., Howells, D.W., Hurn, P.D., Kent, T.A., Savitz, S.I., Lo, E.H., and Group, S. (2009).** Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke* 40, 2244-2250.
- Fisher, M., and Roundtable, S.T.A.I. (2003).** Recommendations for advancing development of acute stroke therapies: Stroke Therapy Academic Industry Roundtable 3. *Stroke* 34, 1539-1546.
- Fisher, M., and Schaebitz, W. (2000).** An overview of acute stroke therapy: past, present, and future. *Arch Intern Med* 160, 3196-3206.
- Fletcher, N., Wahlström, D., Lundberg, R., Nilsson, C.B., Nilsson, K.C., Stockling, K., Hellmold, H., and Håkansson, H. (2005).** 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters the mRNA expression of critical genes associated with cholesterol metabolism, bile acid biosynthesis, and bile transport in rat liver: a microarray study. *Toxicol Appl Pharmacol* 207, 1-24.
- Flynn, R.W., MacWalter, R.S., and Doney, A.S. (2008).** The cost of cerebral ischaemia. *Neuropharmacology* 55, 250-256.
- Francescutti, C., Mariotti, S., Simon, G., D'Errigo, P., and Di Bidino, R. (2005).** The impact of stroke in Italy: first step for a National Burden of Disease Study. *Disabil Rehabil* 27, 229-240.
- Francklin K.B.J., and Paxinos G. (2007).** The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates Third Edition.
- Frederickson, C.J., Maret, W., and Cuajungco, M.P. (2004).** Zinc and excitotoxic brain injury: a new model. *Neuroscientist* 10, 18-25.
- Fridovich, I. (1978).** The biology of oxygen radicals. *Science* 201, 875-880.
- Fujii-Kuriyama, Y., and Kawajiri, K. (2010).** Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86, 40-53.
- Fujimoto, M., Takagi, Y., Aoki, T., Hayase, M., Marumo, T., Gomi, M., Nishimura, M., Kataoka, H., Hashimoto, N., and Nozaki, K. (2008).** Tissue inhibitor of metalloproteinases protect blood-brain barrier disruption in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 1674-1685.

Fukui, S., Schwarcz, R., Rapoport, S.I., Takada, Y., and Smith, Q.R. (1991). Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism. *J Neurochem* 56, 2007-2017.

Fukunaga, B.N., Probst, M.R., Reisz-Porszasz, S., and Hankinson, O. (1995). Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 270, 29270-29278.

Furness, S.G., Lees, M.J., and Whitelaw, M.L. (2007). The dioxin (aryl hydrocarbon) receptor as a model for adaptive responses of bHLH/PAS transcription factors. *FEBS Lett* 581, 3616-3625.

Furness, S.G., and Whelan, F. (2009). The pleiotropy of dioxin toxicity--xenobiotic misappropriation of the aryl hydrocarbon receptor's alternative physiological roles. *Pharmacol Ther* 124, 336-353.

G

Gardoni, F., Mauceri, D., Malinverno, M., Polli, F., Costa, C., Tozzi, A., Silivini, S., Picconi, B., Cattabeni, F., Calabresi, P., et al. (2009). Decreased NR2B subunit synaptic levels cause impaired long-term potentiation but not long-term depression. *J Neurosci* 29, 669-677.

Gardoni, F., Picconi, B., Ghiglieri, V., Polli, F., Bagetta, V., Bernardi, G., Cattabeni, F., Di Luca, M., and Calabresi, P. (2006). A critical interaction between NR2B and MAGUK in L-DOPA induced dyskinesia. *J Neurosci* 26, 2914-2922.

Gardoni, F., Schrama, L.H., Kamal, A., Gispen, W.H., Cattabeni, F., and Di Luca, M. (2001). Hippocampal synaptic plasticity involves competition between Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and postsynaptic density 95 for binding to the NR2A subunit of the NMDA receptor. *J Neurosci* 21, 1501-1509.

Gascón, S., Sobrado, M., Roda, J.M., Rodríguez-Peña, A., and Díaz-Guerra, M. (2008). Excitotoxicity and focal cerebral ischemia induce truncation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor and cleavage of the scaffolding protein PSD-95. *Mol Psychiatry* 13, 99-114.

Gassmann, K., Abel, J., Bothe, H., Haarmann-Stemmann, T., Merk, H.F., Quasthoff, K.N., Rockel, T.D., Schreiber,

T., and Fritsche, E. (2010). Species-specific differential AhR expression protects human neural progenitor cells against developmental neurotoxicity of PAHs. *Environ Health Perspect* 118, 1571-1577.

Ge, N.L., and Elferink, C.J. (1998). A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. Linking dioxin signaling to the cell cycle. *J Biol Chem* 273, 22708-22713.

Gelderblom, M., Leypoldt, F., Steinbach, K., Behrens, D., Choe, C.U., Siler, D.A., Arumugam, T.V., Orthey, E., Gerloff, C., Tolosa, E., et al. (2009). Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke* 40, 1849-1857.

Gibney, S.M., McGuinness, B., Prendergast, C., Harkin, A., and Connor, T.J. (2012). Poly I:C-induced activation of the immune response is accompanied by depression and anxiety-like behaviours, kynurenine pathway activation and reduced BDNF expression. *Brain Behav Immun*.

Gielen, M., Siegler Retchless, B., Mony, L., Johnson, J.W., and Paoletti, P. (2009). Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature* 459, 703-707.

Gigler, G., Szénási, G., Simó, A., Lévy, G., Hársing, L.G., Sas, K., Vécsei, L., and Toldi, J. (2007). Neuroprotective effect of L-kynurenine sulfate administered before focal cerebral ischemia in mice and global cerebral ischemia in gerbils. *Eur J Pharmacol* 564, 116-122.

Go, A.S., Mozaffarian, D., Roger, V.L., Benjamin, E.J., Berry, J.D., Borden, W.B., Bravata, D.M., Dai, S., Ford, E.S., Fox, C.S., et al. (2012). Heart Disease and Stroke Statistics--2013 Update A Report From the American Heart Association. *Circulation*.

Goetz, C.G., Bolla, K.I., and Rogers, S.M. (1994). Neurologic health outcomes and Agent Orange: Institute of Medicine report. *Neurology* 44, 801-809.

Gold, A.B., Herrmann, N., Swardfager, W., Black, S.E., Aviv, R.I., Tennen, G., Kiss, A., and Lanctôt, K.L. (2011). The relationship between indoleamine 2,3-dioxygenase

activity and post-stroke cognitive impairment. *J Neuroinflammation* 8, 17.

Gomez-Duran, A., Carvajal-Gonzalez, J.M., Mulero-Navarro, S., Santiago-Josefat, B., Puga, A., and Fernández-Salguero, P.M. (2009). Fitting a xenobiotic receptor into cell homeostasis: how the dioxin receptor interacts with TGFbeta signaling. *Biochem Pharmacol* 77, 700-712.

Gouédard, C., Barouki, R., and Morel, Y. (2004). Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 24, 5209-5222.

Gray, J.A., Shi, Y., Usui, H., During, M.J., Sakimura, K., and Nicoll, R.A. (2011). Distinct modes of AMPA receptor suppression at developing synapses by GluN2A and GluN2B: single-cell NMDA receptor subunit deletion in vivo. *Neuron* 71, 1085-1101.

Green, D.R., and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.

Greenberg, M.E., Xu, B., Lu, B., and Hempstead, B.L. (2009). New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J Neurosci* 29, 12764-12767.

Greengard, P. (2001). The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* 294, 1024-1030.

Groc, L., Bard, L., and Choquet, D. (2009). Surface trafficking of N-methyl-D-aspartate receptors: physiological and pathological perspectives. *Neuroscience* 158, 4-18.

Groc, L., and Choquet, D. (2009). [The neuronal surface: a new land to regulate neuronal communication]. *Med Sci (Paris)* 25, 895-897.

Groc, L., Heine, M., Cousins, S.L., Stephenson, F.A., Lounis, B., Cognet, L., and Choquet, D. (2006). NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18769-18774.

Guillemin, G.J., Cullen, K.M., Lim, C.K., Smythe, G.A., Garner, B., Kapoor, V., Takikawa, O., and Brew, B.J. (2007). Characterization of the kynurenine pathway in human neurons. *J Neurosci* 27, 12884-12892.

Guillemin, G.J., Smith, D.G., Smythe, G.A., Armati, P.J., and Brew, B.J. (2003a). Expression of the kynurenine pathway enzymes in human microglia and macrophages. *Adv Exp Med Biol* 527, 105-112.

Guillemin, G.J., Smythe, G., Takikawa, O., and Brew, B.J. (2005). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons. *Glia* 49, 15-23.

Guillemin, G.J., Williams, K.R., Smith, D.G., Smythe, G.A., Croitoru-Lamoury, J., and Brew, B.J. (2003b). Quinolinic acid in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Adv Exp Med Biol* 527, 167-176.

Gunter, T.E., and Pfeiffer, D.R. (1990). Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* 258, C755-786.

Guttmann, R.P., Baker, D.L., Seifert, K.M., Cohen, A.S., Coulter, D.A., and Lynch, D.R. (2001). Specific proteolysis of the NR2 subunit at multiple sites by calpain. *J Neurochem* 78, 1083-1093.

Guttmann, R.P., Sokol, S., Baker, D.L., Simpkins, K.L., Dong, Y., and Lynch, D.R. (2002). Proteolysis of the N-methyl-D-aspartate receptor by calpain in situ. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 1023-1030.

Guyot, E., Chevallier, A., Barouki, R., and Coumoul, X. (2012). The AhR twist: ligand-dependent AhR signaling and pharmacotoxicological implications. *Drug Discov Today*.

Gál, E.M., and Sherman, A.D. (1978). Synthesis and metabolism of L-kynurenine in rat brain. *J Neurochem* 30, 607-613.

Gál, E.M., and Sherman, A.D. (1980). L-kynurenine: its synthesis and possible regulatory function in brain. *Neurochem Res* 5, 223-239.

H

Hacke, W., Kaste, M., Bluhmki, E., Brozman, M., Dávalos, A., Guidetti, D., Larrue, V., Lees, K.R., Medeghri, Z., Machnig, T., et al. (2008). Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 359, 1317-1329.

- Hahn, M.E. (2002).** Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact* 141, 131-160.
- Hahn, M.E., Karchner, S.I., Evans, B.R., Franks, D.G., Merson, R.R., and Lapseritis, J.M. (2006).** Unexpected diversity of aryl hydrocarbon receptors in non-mammalian vertebrates: insights from comparative genomics. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 305, 693-706.
- Hankinson, O. (1995).** The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35, 307-340.
- Hanneman, W.H., Legare, M.E., Barhoumi, R., Burghardt, R.C., Safe, S., and Tiffany-Castiglioni, E. (1996).** Stimulation of calcium uptake in cultured rat hippocampal neurons by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology* 112, 19-28.
- Hansen, H.H., Briem, T., Dzierko, M., Siffringer, M., Voss, A., Rzeski, W., Zdzisinska, B., Thor, F., Heumann, R., Stepulak, A., et al. (2004).** Mechanisms leading to disseminated apoptosis following NMDA receptor blockade in the developing rat brain. *Neurobiol Dis* 16, 440-453.
- Hao, K., Zhou, Q., Chen, W., Jia, W., Zheng, J., Kang, J., Wang, K., and Duan, T. (2013).** Possible role of the 'IDO-AhR axis' in maternal-foetal tolerance. *Cell Biol Int* 37, 105-108.
- Hardingham, G.E. (2006).** Pro-survival signalling from the NMDA receptor. *Biochem Soc Trans* 34, 936-938.
- Hardingham, G.E. (2006b).** Pro-survival signalling from the NMDA receptor. *Biochem Soc Trans* 34, 936-938.
- Hardingham, G.E. (2009).** Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochem Soc Trans* 37, 1147-1160.
- Hardingham, G.E., and Bading, H. (2002).** Coupling of extrasynaptic NMDA receptors to a CREB shut-off pathway is developmentally regulated. *Biochim Biophys Acta* 1600, 148-153.
- Hardingham, G.E., and Bading, H. (2010).** Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 11, 682-696.
- Hardingham, G.E., Fukunaga, Y., and Bading, H. (2002).** Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5, 405-414.
- Harper, P.A., Riddick, D.S., and Okey, A.B. (2006).** Regulating the regulator: factors that control levels and activity of the aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Pharmacol* 72, 267-279.
- Harper, P.A., Wong, J., Lam, M.S., and Okey, A.B. (2002).** Polymorphisms in the human AH receptor. *Chem Biol Interact* 141, 161-187.
- Harraz, M.M., Eacker, S.M., Wang, X., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2012).** MicroRNA-223 is neuroprotective by targeting glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 18962-18967.
- Harris, A.Z., and Pettit, D.L. (2007).** Extrasynaptic and synaptic NMDA receptors form stable and uniform pools in rat hippocampal slices. *J Physiol* 584, 509-519.
- Harris, C.A., Miranda, A.F., Tanguay, J.J., Boegman, R.J., Beninger, R.J., and Jhamandas, K. (1998).** Modulation of striatal quinolinate neurotoxicity by elevation of endogenous brain kynurenic acid. *Br J Pharmacol* 124, 391-399.
- Hayes, K.R., Zastrow, G.M., Nukaya, M., Pande, K., Glover, E., Maufort, J.P., Liss, A.L., Liu, Y., Moran, S.M., Vollrath, A.L., et al. (2007).** Hepatic transcriptional networks induced by exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Chem Res Toxicol* 20, 1573-1581.
- Hays, L.E., Carpenter, C.D., and Petersen, S.L. (2002).** Evidence that GABAergic neurons in the preoptic area of the rat brain are targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin during development. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 3, 369-376.
- Hegde, A.N., Inokuchi, K., Pei, W., Casadio, A., Ghirardi, M., Chain, D.G., Martin, K.C., Kandel, E.R., and Schwartz, J.H. (1997).** Ubiquitin C-terminal hydrolase is an immediate-early gene essential for long-term facilitation in Aplysia. *Cell* 89, 115-126.
- Heid, S.E., Pollenz, R.S., and Swanson, H.I. (2000).** Role of heat shock protein 90

- dissociation in mediating agonist-induced activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol* 57, 82-92.
- Helferich, W.G., and Denison, M.S. (1991). Ultraviolet photoproducts of tryptophan can act as dioxin agonists. *Mol Pharmacol* 40, 674-678.
- Henklová, P., Vrzal, R., Ulrichová, J., and Dvorák, Z. (2008). Role of mitogen-activated protein kinases in aryl hydrocarbon receptor signaling. *Chem Biol Interact* 172, 93-104.
- Hetman, M., and Kharebava, G. (2006). Survival signaling pathways activated by NMDA receptors. *Curr Top Med Chem* 6, 787-799.
- Heyes, M.P., and Nowak, T.S. (1990). Delayed increases in regional brain quinolinic acid follow transient ischemia in the gerbil. *J Cereb Blood Flow Metab* 10, 660-667.
- Heyes, M.P., Saito, K., Major, E.O., Milstien, S., Markey, S.P., and Vickers, J.H. (1993). A mechanism of quinolinic acid formation by brain in inflammatory neurological disease. Attenuation of synthesis from L-tryptophan by 6-chlorotryptophan and 4-chloro-3-hydroxyanthranilate. *Brain* 116 (Pt 6), 1425-1450.
- Higginbotham, G.R., Huang, A., Firestone, D., Verrett, J., Ress, J., and Campbell, A.D. (1968). Chemical and toxicological evaluations of isolated and synthetic chloro derivatives of dibenzo-p-dioxin. *Nature* 220, 702-703.
- Higuchi, M., Tomioka, M., Takano, J., Shirotani, K., Iwata, N., Masumoto, H., Maki, M., Itohara, S., and Saido, T.C. (2005). Distinct mechanistic roles of calpain and caspase activation in neurodegeneration as revealed in mice overexpressing their specific inhibitors. *J Biol Chem* 280, 15229-15237.
- Hinoi, E., Takarada, T., Tsuchihashi, Y., and Yoneda, Y. (2005). Glutamate transporters as drug targets. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4, 211-220.
- Hochrainer, K., Jackman, K., Anrather, J., and Iadecola, C. (2012). Reperfusion rather than ischemia drives the formation of ubiquitin aggregates after middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 43, 2229-2235.
- Hoshi, M., Saito, K., Murakami, Y., Taguchi, A., Fujigaki, H., Tanaka, R., Takemura, M., Ito, H., Hara, A., and Seishima, M. (2009). Marked increases in hippocampal neuron indoleamine 2, 3-dioxygenase via IFN-gamma-independent pathway following transient global ischemia in mouse. *Neurosci Res* 63, 194-198.
- Hossmann, K.A. (1994). Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36, 557-565.
- Hossmann, K.A. (2008). Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacology* 55, 257-270.
- Hossmann, K.A. (2009). Pathophysiological basis of translational stroke research. *Folia Neuropathol* 47, 213-227.
- Hossmann, K.A. (2012). The two pathophysiologies of focal brain ischemia: implications for translational stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab* 32, 1310-1316.
- Hossmann, K.A., and Traystman, R.J. (2009). Cerebral blood flow and the ischemic penumbra. *Handb Clin Neurol* 92, 67-92.
- Hu, B.R., Janelidze, S., Ginsberg, M.D., Busto, R., Perez-Pinzon, M., Sick, T.J., Siesjö, B.K., and Liu, C.L. (2001). Protein aggregation after focal brain ischemia and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 21, 865-875.
- Huang, X., Powell-Coffman, J.A., and Jin, Y. (2004). The AHR-1 aryl hydrocarbon receptor and its co-factor the AHA-1 aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator specify GABAergic neuron cell fate in *C. elegans*. *Development* 131, 819-828.
- Hurtado, O., Ballesteros, I., Cuartero, M.I., Moraga, A., Pradillo, J.M., Ramírez-Franco, J., Bartolomé-Martín, D., Pascual, D., Torres, M., Sánchez-Prieto, J., et al. (2012). Daidzein has neuroprotective effects through ligand-binding-independent PPAR γ activation. *Neurochem Int* 61, 119-127.
- Hurtado, O., Lizasoain, I., Fernández-Tomé, P., Alvarez-Barrientos, A., Leza, J.C., Lorenzo, P., and Moro, M.A. (2002).

TACE/ADAM17-TNF-alpha pathway in rat cortical cultures after exposure to oxygen-glucose deprivation or glutamate. *J Cereb Blood Flow Metab* 22, 576-585.

I

Iadecola, C., and Anrather, J. (2011). The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 17, 796-808.

Ichinose, T., Yu, S., Wang, X.Q., and Yu, S.P. (2003). Ca²⁺-independent, but voltage- and activity-dependent regulation of the NMDA receptor outward K⁺ current in mouse cortical neurons. *J Physiol* 551, 403-417.

Ikedo, M., Mitsui, T., Setani, K., Tamura, M., Kakeyama, M., Sone, H., Tohyama, C., and Tomita, T. (2005). In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats disrupts brain sexual differentiation. *Toxicol Appl Pharmacol* 205, 98-105.

Ikonomidou, C., and Turski, L. (2002). Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol* 1, 383-386.

Ikuta, T., Eguchi, H., Tachibana, T., Yoneda, Y., and Kawajiri, K. (1998). Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 273, 2895-2904.

Ikuta, T., Kobayashi, Y., and Kawajiri, K. (2004). Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 317, 545-550.

Ikuta, T., Tachibana, T., Watanabe, J., Yoshida, M., Yoneda, Y., and Kawajiri, K. (2000). Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biochem* 127, 503-509.

J

Jain, S., Maltepe, E., Lu, M.M., Simon, C., and Bradfield, C.A. (1998). Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 alpha, HIF2 alpha and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mech Dev* 73, 117-123.

Jauch, E.C., Saver, J.L., Adams, H.P., Bruno, A., Connors, J.J., Demaerschalk, B.M., Khatri, P., McMullan, P.W., Qureshi, A.I., Rosenfield, K., et al. (2013).

Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 44, 870-947.

Jiang, T., Bell, D.R., Clode, S., Fan, M.Q., Fernandes, A., Foster, P.M., Loizou, G., MacNicol, A., Miller, B.G., Rose, M., et al. (2009). A truncation in the aryl hydrocarbon receptor of the CRL:WI(Han) rat does not affect the developmental toxicity of TCDD. *Toxicol Sci* 107, 512-521.

Jiang, Y.H., Armstrong, D., Albrecht, U., Atkins, C.M., Noebels, J.L., Eichele, G., Sweatt, J.D., and Beaudet, A.L. (1998). Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation. *Neuron* 21, 799-811.

Jin, R., Yang, G., and Li, G. (2010). Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol* 87, 779-789.

Johnston, S.C., Mendis, S., and Mathers, C.D. (2009). Global variation in stroke burden and mortality: estimates from monitoring, surveillance, and modelling. *Lancet Neurol* 8, 345-354.

K

Kajta, M., Wójtowicz, A.K., Maćkowiak, M., and Lasoń, W. (2009). Aryl hydrocarbon receptor-mediated apoptosis of neuronal cells: a possible interaction with estrogen receptor signaling. *Neuroscience* 158, 811-822.

Kallio, P.J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H., and Poellinger, L. (1998). Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J* 17, 6573-6586.

Kamiya, T., Katayama, Y., Kashiwagi, F., and Terashi, A. (1993). The role of bradykinin in mediating ischemic brain edema in rats. *Stroke* 24, 571-575; discussion 575-576.

Katsura, K., Kristián, T., and Siesjö, B.K. (1994). Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans* 22, 991-996.

- Kawajiri, K., Kobayashi, Y., Ohtake, F., Ikuta, T., Matsushima, Y., Mimura, J., Pettersson, S., Pollenz, R.S., Sakaki, T., Hirokawa, T., et al. (2009). Aryl hydrocarbon receptor suppresses intestinal carcinogenesis in ApcMin/+ mice with natural ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13481-13486.
- Kazlauskas, A., Poellinger, L., and Pongratz, I. (1999). Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem* 274, 13519-13524.
- Kerkvliet, N.I., Baecher-Steppan, L., Smith, B.B., Youngberg, J.A., Henderson, M.C., and Buhler, D.R. (1990). Role of the Ah locus in suppression of cytotoxic T lymphocyte activity by halogenated aromatic hydrocarbons (PCBs and TCDD): structure-activity relationships and effects in C57Bl/6 mice congenic at the Ah locus. *Fundam Appl Toxicol* 14, 532-541.
- Kew, J.N., Trube, G., and Kemp, J.A. (1998). State-dependent NMDA receptor antagonism by Ro 8-4304, a novel NR2B selective, non-competitive, voltage-independent antagonist. *Br J Pharmacol* 123, 463-472.
- Kewley, R.J., Whitelaw, M.L., and Chapman-Smith, A. (2004). The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 189-204.
- Khanna, A., Guo, M., Mehra, M., and Royal, W. (2013). Inflammation and oxidative stress induced by cigarette smoke in Lewis rat brains. *J Neuroimmunol* 254, 69-75.
- Kiank, C., Zeden, J.P., Drude, S., Domanska, G., Fusch, G., Otten, W., and Schuett, C. (2010). Psychological stress-induced, IDO1-dependent tryptophan catabolism: implications on immunosuppression in mice and humans. *PLoS One* 5, e11825.
- Kim, E., and Sheng, M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5, 771-781.
- Kim, M.D., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2006). The bHLH-PAS protein Spineless is necessary for the diversification of dendrite morphology of *Drosophila* dendritic arborization neurons. *Genes Dev* 20, 2806-2819.
- Kim, M.J., Dunah, A.W., Wang, Y.T., and Sheng, M. (2005). Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. *Neuron* 46, 745-760.
- Kim, S.Y., and Yang, J.H. (2005). Neurotoxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cerebellar granule cells. *Exp Mol Med* 37, 58-64.
- Kim, Y.R., Tejima, E., Huang, S., Atochin, D.N., Dai, G., Lo, E.H., Huang, P.L., Bogdanov, A., and Rosen, B.R. (2008). In vivo quantification of transvascular water exchange during the acute phase of permanent stroke. *Magn Reson Med* 60, 813-821.
- Kitajima, M., Khan, K.N., Fujishita, A., Masuzaki, H., Koji, T., and Ishimaru, T. (2004). Expression of the arylhydrocarbon receptor in the peri-implantation period of the mouse uterus and the impact of dioxin on mouse implantation. *Arch Histol Cytol* 67, 465-474.
- Kitamura, C., Takahashi, M., Kondoh, Y., Tashiro, H., and Tashiro, T. (2007). Identification of synaptic activity-dependent genes by exposure of cultured cortical neurons to tetrodotoxin followed by its withdrawal. *J Neurosci Res* 85, 2385-2399.
- Kobayashi, A., Numayama-Tsuruta, K., Sogawa, K., and Fujii-Kuriyama, Y. (1997). CBP/p300 functions as a possible transcriptional coactivator of Ah receptor nuclear translocator (Arnt). *J Biochem* 122, 703-710.
- Kokaia, Z., Andsberg, G., Yan, Q., and Lindvall, O. (1998). Rapid alterations of BDNF protein levels in the rat brain after focal ischemia: evidence for increased synthesis and anterograde axonal transport. *Experimental neurology* 154, 289-301.
- Kokaia, Z., Zhao, Q., Kokaia, M., Elmer, E., Metsis, M., Smith, M.L., Siesjo, B.K., and Lindvall, O. (1995). Regulation of brain-derived neurotrophic factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion with and without brain

damage. *Experimental neurology* 136, 73-88.

Kontos, H.A. (1985). George E. Brown memorial lecture. Oxygen radicals in cerebral vascular injury. *Circ Res* 57, 508-516.

Kostandy, B.B. (2012). The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. *Neurol Sci* 33, 223-237.

Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87, 99-163.

Krupp, J.J., Vissel, B., Thomas, C.G., Heinemann, S.F., and Westbrook, G.L. (1999). Interactions of calmodulin and alpha-actinin with the NR1 subunit modulate Ca²⁺-dependent inactivation of NMDA receptors. *J Neurosci* 19, 1165-1178.

Kumar, M.B., and Perdew, G.H. (1999). Nuclear receptor coactivator SRC-1 interacts with the Q-rich subdomain of the AhR and modulates its transactivation potential. *Gene Expr* 8, 273-286.

Kumar, M.B., Tarpey, R.W., and Perdew, G.H. (1999). Differential recruitment of coactivator RIP140 by Ah and estrogen receptors. Absence of a role for LXXLL motifs. *J Biol Chem* 274, 22155-22164.

Kwok, R.P., Lundblad, J.R., Chrivia, J.C., Richards, J.P., Bächinger, H.P., Brennan, R.G., Roberts, S.G., Green, M.R., and Goodman, R.H. (1994). Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370, 223-226.

L

Lahvis, G.P., and Bradfield, C.A. (1998). Ahr null alleles: distinctive or different? *Biochem Pharmacol* 56, 781-787.

Lahvis, G.P., Lindell, S.L., Thomas, R.S., McCuskey, R.S., Murphy, C., Glover, E., Bentz, M., Southard, J., and Bradfield, C.A. (2000). Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10442-10447.

Lahvis, G.P., Pyzalski, R.W., Glover, E., Pitot, H.C., McElwee, M.K., and Bradfield, C.A. (2005). The aryl hydrocarbon receptor is required for developmental closure of the ductus venosus in the neonatal mouse. *Mol Pharmacol* 67, 714-720.

Latchney, S.E., Hein, A.M., O'Banion, M.K., Dicicco-Bloom, E., and Opanashuk, L.A. (2012). Deletion or activation of the aryl hydrocarbon receptor alters adult hippocampal neurogenesis and contextual fear memory. *J Neurochem*.

Lau, C.G., and Zukin, R.S. (2007). NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 8, 413-426.

Lau, D., and Bading, H. (2009). Synaptic activity-mediated suppression of p53 and induction of nuclear calcium-regulated neuroprotective genes promote survival through inhibition of mitochondrial permeability transition. *J Neurosci* 29, 4420-4429.

Lau, G.C., Saha, S., Faris, R., and Russek, S.J. (2004). Up-regulation of NMDAR1 subunit gene expression in cortical neurons via a PKA-dependent pathway. *J Neurochem* 88, 564-575.

Laurie, D.J., and Seeburg, P.H. (1994). Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. *J Neurosci* 14, 3180-3194.

Lee, Y.H., Fang, K.M., Yang, C.M., Hwang, H.M., Chiu, C.T., and Tsai, W. (2000). Kainic acid-induced neurotrophic activities in developing cortical neurons. *J Neurochem* 74, 2401-2411.

Lees, M.J., and Whitelaw, M.L. (1999). Multiple roles of ligand in transforming the dioxin receptor to an active basic helix-loop-helix/PAS transcription factor complex with the nuclear protein Arnt. *Mol Cell Biol* 19, 5811-5822.

Lemarchant, S., Docagne, F., Emery, E., Vivien, D., Ali, C., and Rubio, M. (2012). tPA in the injured central nervous system: different scenarios starring the same actor? *Neuropharmacology* 62, 749-756.

Leonard, A.S., and Hell, J.W. (1997). Cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylate N-methyl-D-aspartate receptors at different sites. *J Biol Chem* 272, 12107-12115.

Lim, C.K., Brew, B.J., Sundaram, G., and Guillemin, G.J. (2010). Understanding the roles of the kynurenine pathway in multiple sclerosis progression. *Int J Tryptophan Res* 3, 157-167.

- Lin, C.H., Chen, C.C., Chou, C.M., Wang, C.Y., Hung, C.C., Chen, J.Y., Chang, H.W., Chen, Y.C., Yeh, G.C., and Lee, Y.H. (2009).** Knockdown of the aryl hydrocarbon receptor attenuates excitotoxicity and enhances NMDA-induced BDNF expression in cortical neurons. *J Neurochem* 111, 777-789.
 - Lin, C.H., Juan, S.H., Wang, C.Y., Sun, Y.Y., Chou, C.M., Chang, S.F., Hu, S.Y., Lee, W.S., and Lee, Y.H. (2008).** Neuronal activity enhances aryl hydrocarbon receptor-mediated gene expression and dioxin neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurochem* 104, 1415-1429.
 - Lipsky, R.H., and Marini, A.M. (2007).** Brain-derived neurotrophic factor in neuronal survival and behavior-related plasticity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1122, 130-143.
 - Liu, P.K., Hsu, C.Y., Dizdaroglu, M., Floyd, R.A., Kow, Y.W., Karakaya, A., Rabow, L.E., and Cui, J.K. (1996).** Damage, repair, and mutagenesis in nuclear genes after mouse forebrain ischemia-reperfusion. *J Neurosci* 16, 6795-6806.
 - Liu, Y., Wong, T.P., Aarts, M., Rooyackers, A., Liu, L., Lai, T.W., Wu, D.C., Lu, J., Tymianski, M., Craig, A.M., et al. (2007).** NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci* 27, 2846-2857.
 - Llansola, M., Sanchez-Perez, A., Cauli, O., and Felipe, V. (2005).** Modulation of NMDA receptors in the cerebellum. 1. Properties of the NMDA receptor that modulate its function. *Cerebellum* 4, 154-161.
 - Lo, E.H., Dalkara, T., and Moskowitz, M.A. (2003).** Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* 4, 399-415.
 - Loew, L.M., Carrington, W., Tuft, R.A., and Fay, F.S. (1994).** Physiological cytosolic Ca²⁺ transients evoke concurrent mitochondrial depolarizations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12579-12583.
 - Long, W.P., and Perdew, G.H. (1999).** Lack of an absolute requirement for the native aryl hydrocarbon receptor (AhR) and AhR nuclear translocator transactivation domains in protein kinase C-mediated modulation of the AhR pathway. *Arch Biochem Biophys* 371, 246-259.
 - Love, S. (1999).** Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol* 9, 119-131.
 - Lucas, D.R., and Newhouse, J.P. (1957).** The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* 58, 193-201.
 - Lund, A.K., Goens, M.B., Kanagy, N.L., and Walker, M.K. (2003).** Cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor null mice is correlated with elevated angiotensin II, endothelin-1, and mean arterial blood pressure. *Toxicol Appl Pharmacol* 193, 177-187.
 - Lund, A.K., Goens, M.B., Nuñez, B.A., and Walker, M.K. (2006).** Characterizing the role of endothelin-1 in the progression of cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor (AhR) null mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 212, 127-135.
 - Lund, A.K., Peterson, S.L., Timmins, G.S., and Walker, M.K. (2005).** Endothelin-1-mediated increase in reactive oxygen species and NADPH Oxidase activity in hearts of aryl hydrocarbon receptor (AhR) null mice. *Toxicol Sci* 88, 265-273.
 - Léveillé, F., El Gaamouch, F., Gouix, E., Lecocq, M., Lobner, D., Nicole, O., and Buisson, A. (2008).** Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *FASEB J* 22, 4258-4271.
 - Léveillé, F., Papadia, S., Fricker, M., Bell, K.F., Soriano, F.X., Martel, M.A., Puddifoot, C., Habel, M., Wyllie, D.J., Ikonomidou, C., et al. (2010).** Suppression of the intrinsic apoptosis pathway by synaptic activity. *J Neurosci* 30, 2623-2635.
- M**
- Ma, Q., and Whitlock, J.P. (1997).** A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Chem* 272, 8878-8884.
 - Machado, F.S., Johndrow, J.E., Esper, L., Dias, A., Bafica, A., Serhan, C.N., and Aliberti, J. (2006).** Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered

- lipoxin are SOCS-2 dependent. *Nat Med* 12, 330-334.
- Madden, D.R. (2002a).** The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci* 3, 91-101.
- Madden, K. (2002b).** NMDA receptor antagonists and glycine site NMDA antagonists. *Curr Med Res Opin* 18 Suppl 2, s27-31.
- Marsh, J.D., and Keyrouz, S.G. (2010).** Stroke prevention and treatment. *J Am Coll Cardiol* 56, 683-691.
- Martel, M.A., Wyllie, D.J., and Hardingham, G.E. (2009).** In developing hippocampal neurons, NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) can mediate signaling to neuronal survival and synaptic potentiation, as well as neuronal death. *Neuroscience* 158, 334-343.
- Martin, L.J., Al-Abdulla, N.A., Brambrink, A.M., Kirsch, J.R., Sieber, F.E., and Portera-Cailliau, C. (1998).** Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* 46, 281-309.
- Martin, R.L., Lloyd, H.G., and Cowan, A.I. (1994).** The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci* 17, 251-257.
- Maruki, C. (1989).** [Monoamine metabolism after transient global ischemia. Mechanism of delayed postischemic hypoperfusion]. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 29, 1093-1100.
- Matikainen, T., Perez, G.I., Jurisicova, A., Pru, J.K., Schlezinger, J.J., Ryu, H.Y., Laine, J., Sakai, T., Korsmeyer, S.J., Casper, R.F., et al. (2001).** Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat Genet* 28, 355-360.
- Matsumoto, H., Kumon, Y., Watanabe, H., Ohnishi, T., Shudou, M., Ii, C., Takahashi, H., Imai, Y., and Tanaka, J. (2007).** Antibodies to CD11b, CD68, and lectin label neutrophils rather than microglia in traumatic and ischemic brain lesions. *J Neurosci Res* 85, 994-1009.
- Matsumoto, Y. (1992).** [Immune defense mechanism in the central nervous system--role of microglia and astrocytes]. *No To Shinkei* 44, 881-892.
- Mattson, M.P. (2008).** Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1144, 97-112.
- Mattson, M.P., Culmsee, C., and Yu, Z.F. (2000a).** Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res* 301, 173-187.
- Mattson, M.P., LaFerla, F.M., Chan, S.L., Leissring, M.A., Shepel, P.N., and Geiger, J.D. (2000b).** Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 23, 222-229.
- McBerry, C., Gonzalez, R.M., Shryock, N., Dias, A., and Aliberti, J. (2012).** SOCS2-induced proteasome-dependent TRAF6 degradation: a common anti-inflammatory pathway for control of innate immune responses. *PLoS One* 7, e38384.
- McKinney, J.D., and Singh, P. (1981).** Structure-activity relationships in halogenated biphenyls: unifying hypothesis for structural specificity. *Chem Biol Interact* 33, 271-283.
- Mehta, A., Prabhakar, M., Kumar, P., Deshmukh, R., and Sharma, P.L. (2013).** Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol* 698, 6-18.
- Meldrum, B., Evans, M., Griffiths, T., and Simon, R. (1985).** Ischaemic brain damage: the role of excitatory activity and of calcium entry. *Br J Anaesth* 57, 44-46.
- Meyer, B.K., Pray-Grant, M.G., Vanden Heuvel, J.P., and Perdew, G.H. (1998).** Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol Cell Biol* 18, 978-988.
- Michaelis, E.K. (1998).** Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 54, 369-415.
- Michel, R.P., and Cruz-Orive, L.M. (1988).** Application of the Cavalieri principle and

vertical sections method to lung: estimation of volume and pleural surface area. *J Microsc* 150, 117-136.

Miller, C.L., Llenos, I.C., Dulay, J.R., Barillo, M.M., Yolken, R.H., and Weis, S. (2004). Expression of the kynurenine pathway enzyme tryptophan 2,3-dioxygenase is increased in the frontal cortex of individuals with schizophrenia. *Neurobiol Dis* 15, 618-629.

Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K., and Fujii-Kuriyama, Y. (1999). Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev* 13, 20-25.

Mimura, J., Yamashita, K., Nakamura, K., Morita, M., Takagi, T.N., Nakao, K., Ema, M., Sogawa, K., Yasuda, M., Katsuki, M., et al. (1997). Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 2, 645-654.

Minnerup, J., Sutherland, B.A., Buchan, A.M., and Kleinschmitz, C. (2012). Neuroprotection for stroke: current status and future perspectives. *Int J Mol Sci* 13, 11753-11772.

Mishizen-Eberz, A.J., Rissman, R.A., Carter, T.L., Ikonovic, M.D., Wolfe, B.B., and Armstrong, D.M. (2004). Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol Dis* 15, 80-92.

Molina, C.A., and Alvarez-Sabín, J. (2009). Recanalization and reperfusion therapies for acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 27 Suppl 1, 162-167.

Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., and Seeburg, P.H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529-540.

Muir, K.W. (2006). Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists. *Curr Opin Pharmacol* 6, 53-60.

Muir, K.W., and Lees, K.R. (2003). Excitatory amino acid antagonists for acute stroke. *Cochrane Database Syst Rev*, CD001244.

Murata, Y., and Constantine-Paton, M. (2013). Postsynaptic Density Scaffold SAP102 Regulates Cortical Synapse Development through EphB and PAK Signaling Pathway. *J Neurosci* 33, 5040-5052.

Murray, I.A., Flaveny, C.A., DiNatale, B.C., Chairo, C.R., Schroeder, J.C., Kusunadi, A., and Perdew, G.H. (2010a). Antagonism of aryl hydrocarbon receptor signaling by 6,2',4'-trimethoxyflavone. *J Pharmacol Exp Ther* 332, 135-144.

Murray, I.A., Morales, J.L., Flaveny, C.A., Dinatale, B.C., Chiaro, C., Gowdahalli, K., Amin, S., and Perdew, G.H. (2010b). Evidence for ligand-mediated selective modulation of aryl hydrocarbon receptor activity. *Mol Pharmacol* 77, 247-254.

N

Nagappan, G., and Lu, B. (2005). Activity-dependent modulation of the BDNF receptor TrkB: mechanisms and implications. *Trends in neurosciences* 28, 464-471.

Nguyen, L.P., and Bradfield, C.A. (2008). The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem Res Toxicol* 21, 102-116.

Nicolai, J., Burbassi, S., Rubin, J., and Meucci, O. (2010). CXCL12 inhibits expression of the NMDA receptor's NR2B subunit through a histone deacetylase-dependent pathway contributing to neuronal survival. *Cell Death Dis* 1, e33.

Nicoletti, F., Bockaert, J., Collingridge, G.L., Conn, P.J., Ferraguti, F., Schoepp, D.D., Wroblewski, J.T., and Pin, J.P. (2011). Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside. *Neuropharmacology* 60, 1017-1041.

Nicotera, P., and Bano, D. (2003). The enemy at the gates. Ca²⁺ entry through TRPM7 channels and anoxic neuronal death. *Cell* 115, 768-770.

Nishijo, M., Kuriwaki, J., Hori, E., Tawara, K., Nakagawa, H., and Nishijo, H. (2007). Effects of maternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on fetal brain growth and motor and behavioral development in offspring rats. *Toxicol Lett* 173, 41-47.

Niswender, C.M., and Conn, P.J. (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50, 295-322.

Niwa, A., Kumaki, K., Nebert, D.W., and Poland, A.P. (1975). Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in the mouse. Distinction between the "responsive" homozygote and heterozygote at the Ah locus. *Arch Biochem Biophys* 166, 559-564.

O

O'Collins, V.E., Macleod, M.R., Donnan, G.A., Horvath, L.L., van der Worp, B.H., and Howells, D.W. (2006). 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol* 59, 467-477.

Oesch-Bartlomowicz, B., Huelster, A., Wiss, O., Antoniou-Lipfert, P., Dietrich, C., Arand, M., Weiss, C., Bockamp, E., and Oesch, F. (2005). Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: divergent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9218-9223.

Oesch-Bartlomowicz, B., and Oesch, F. (2009). Role of cAMP in mediating AHR signaling. *Biochem Pharmacol* 77, 627-641.

Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Nohara, K., Chiba, T., et al. (2007). Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 562-566.

Okragly, A.J., and Haak-Frendscho, M. (1997). An acid-treatment method for the enhanced detection of GDNF in biological samples. *Exp Neurol* 145, 592-596.

Olney, J.W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164, 719-721.

Olney, J.W., and de Gubareff, T. (1978). Glutamate neurotoxicity and Huntington's chorea. *Nature* 271, 557-559.

Omicinski, C.J., Redlich, C.A., and Costa, P. (1990). Induction and developmental expression of cytochrome P450IA1 messenger RNA in rat and human tissues: detection by the polymerase chain reaction. *Cancer Res* 50, 4315-4321.

Opitz, C.A., Litzenburger, U.M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S.,

Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., et al. (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 478, 197-203.

Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 552-565.

Ozawa, S., Kamiya, H., and Tsuzuki, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54, 581-618.

P

Paoletti, P., and Neyton, J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 7, 39-47.

Papadia, S., Soriano, F.X., Léveillé, F., Martel, M.A., Dakin, K.A., Hansen, H.H., Kaindl, A., Siffringer, M., Fowler, J., Stefovská, V., et al. (2008). Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat Neurosci* 11, 476-487.

Papadia, S., Stevenson, P., Hardingham, N.R., Bading, H., and Hardingham, G.E. (2005). Nuclear Ca²⁺ and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection. *J Neurosci* 25, 4279-4287.

Parameshwaran, K., Dhanasekaran, M., and Suppiramaniam, V. (2008). Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation. *Exp Neurol* 210, 7-13.

Pardridge, W.M. (1998). Blood-brain barrier carrier-mediated transport and brain metabolism of amino acids. *Neurochem Res* 23, 635-644.

Paschen, W., and Doutheil, J. (1999). Disturbances of the functioning of endoplasmic reticulum: a key mechanism underlying neuronal cell injury? *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 1-18.

Patandin, S., Koopman-Esseboom, C., de Ridder, M.A., Weisglas-Kuperus, N., and Sauer, P.J. (1998). Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on birth size and growth in Dutch children. *Pediatr Res* 44, 538-545.

Patandin, S., Lanting, C.I., Mulder, P.G., Boersma, E.R., Sauer, P.J., and Weisglas-

- Kuperus, N. (1999). Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on cognitive abilities in Dutch children at 42 months of age. *J Pediatr* 134, 33-41.
- Patel, R.D., and Saver, J.L. (2013). Evolution of reperfusion therapies for acute brain and acute myocardial ischemia: a systematic, comparative analysis. *Stroke* 44, 94-98.
- Pawson, T., and Scott, J.D. (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278, 2075-2080.
- Peled-Kamar, M., Lotem, J., Wirguin, I., Weiner, L., Hermalin, A., and Groner, Y. (1997). Oxidative stress mediates impairment of muscle function in transgenic mice with elevated level of wild-type Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3883-3887.
- Pellegrini-Giampietro, D.E. (2003). The distinct role of mGlu1 receptors in post-ischemic neuronal death. *Trends Pharmacol Sci* 24, 461-470.
- Perdew, G.H. (1988). Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J Biol Chem* 263, 13802-13805.
- Perdew, G.H., and Bradfield, C.A. (1996). Mapping the 90 kDa heat shock protein binding region of the Ah receptor. *Biochem Mol Biol Int* 39, 589-593.
- Perkins, M.N., Collins, J.F., and Stone, T.W. (1982). Isomers of 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid as antagonists of neuronal excitants. *Neurosci Lett* 32, 65-68.
- Petersen, S.L., Curran, M.A., Marconi, S.A., Carpenter, C.D., Lubbers, L.S., and McAbee, M.D. (2000). Distribution of mRNAs encoding the arylhydrocarbon receptor, arylhydrocarbon receptor nuclear translocator, and arylhydrocarbon receptor nuclear translocator-2 in the rat brain and brainstem. *J Comp Neurol* 427, 428-439.
- Petralia, R.S. (2012). Distribution of extrasynaptic NMDA receptors on neurons. *ScientificWorldJournal* 2012, 267120.
- Petroff, B.K., Valdez, K.E., Brown, S.B., Piasecka, J., and Albertini, D.F. (2011). The aryl hydrocarbon receptor agonist 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD) alters early embryonic development in a rat IVF exposure model. *Reprod Toxicol* 32, 286-292.
- Petrulis, J.R., Kusnadi, A., Ramadoss, P., Hollingshead, B., and Perdew, G.H. (2003). The hsp90 Co-chaperone XAP2 alters importin beta recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity. *J Biol Chem* 278, 2677-2685.
- Petzold, G.C., Einhupl, K.M., Dirnagl, U., and Dreier, J.P. (2003). Ischemia triggered by spreading neuronal activation is induced by endothelin-1 and hemoglobin in the subarachnoid space. *Ann Neurol* 54, 591-598.
- Phelan, D., Winter, G.M., Rogers, W.J., Lam, J.C., and Denison, M.S. (1998). Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin. *Arch Biochem Biophys* 357, 155-163.
- Piedrafita, B., Erceg, S., Cauli, O., and Felipo, V. (2008). Developmental exposure to polychlorinated biphenyls or methylmercury, but not to its combination, impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway and learning in 3-month-old rats. *Neuroscience* 154, 1408-1416.
- Pignataro, G., Gala, R., Cuomo, O., Tortiglione, A., Giaccio, L., Castaldo, P., Sirabella, R., Matrone, C., Canitano, A., Amoroso, S., et al. (2004). Two sodium/calcium exchanger gene products, NCX1 and NCX3, play a major role in the development of permanent focal cerebral ischemia. *Stroke* 35, 2566-2570.
- Pilotte, L., Larrieu, P., Stroobant, V., Colau, D., Dolusic, E., Fredrick, R., De Plaen, E., Uyttenhove, C., Wouters, J., Masereel, B., et al. (2012). Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 2497-2502.
- Planells-Cases, R., Lerma, J., and Ferrer-Montiel, A. (2006). Pharmacological intervention at ionotropic glutamate receptor complexes. *Curr Pharm Des* 12, 3583-3596.
- Platten, M., Litzenburger, U., and Wick, W. (2012). The aryl hydrocarbon receptor in tumor immunity. *Oncoimmunology* 1, 396-397.

- Pohl, D., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Stadthaus, D., Hübner, C., Olney, J.W., Turski, L., and Ikonomidou, C. (1999). N-Methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2508-2513.
- Poland, A., and Glover, E. (1974). Comparison of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, a potent inducer of aryl hydrocarbon hydroxylase, with 3-methylcholanthrene. *Mol Pharmacol* 10, 349-359.
- Poland, A., and Glover, E. (1977). Chlorinated biphenyl induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity: a study of the structure-activity relationship. *Mol Pharmacol* 13, 924-938.
- Poland, A., Glover, E., and Taylor, B.A. (1987). The murine Ah locus: a new allele and mapping to chromosome 12. *Mol Pharmacol* 32, 471-478.
- Poland, A., and Knutson, J.C. (1982). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22, 517-554.
- Poland, A.P., Glover, E., Robinson, J.R., and Nebert, D.W. (1974). Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase activity. Induction of monooxygenase activities and cytochrome P1-450 formation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice genetically "nonresponsive" to other aromatic hydrocarbons. *J Biol Chem* 249, 5599-5606.
- Pollenz, R.S. (2002). The mechanism of AH receptor protein down-regulation (degradation) and its impact on AH receptor-mediated gene regulation. *Chem Biol Interact* 141, 41-61.
- Pollenz, R.S., Sattler, C.A., and Poland, A. (1994). The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy. *Mol Pharmacol* 45, 428-438.
- Powell-Coffman, J.A., Bradfield, C.A., and Wood, W.B. (1998). Caenorhabditis elegans orthologs of the aryl hydrocarbon receptor and its heterodimerization partner the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2844-2849.
- Powers, B.E., Lin, T.M., Vanka, A., Peterson, R.E., Juraska, J.M., and Schantz, S.L. (2005). Tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure alters radial arm maze performance and hippocampal morphology in female AhR mice. *Genes Brain Behav* 4, 51-59.
- Proctor, D.T., Coulson, E.J., and Dodd, P.R. (2010). Reduction in post-synaptic scaffolding PSD-95 and SAP-102 protein levels in the Alzheimer inferior temporal cortex is correlated with disease pathology. *J Alzheimers Dis* 21, 795-811.
- Prybylowski, K., Chang, K., Sans, N., Kan, L., Vicini, S., and Wenthold, R.J. (2005). The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2. *Neuron* 47, 845-857.
- Puga, A., Barnes, S.J., Chang, C., Zhu, H., Nephew, K.P., Khan, S.A., and Shertzer, H.G. (2000a). Activation of transcription factors activator protein-1 and nuclear factor-kappaB by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochem Pharmacol* 59, 997-1005.
- Puga, A., Barnes, S.J., Dalton, T.P., Chang, C., Knudsen, E.S., and Maier, M.A. (2000b). Aromatic hydrocarbon receptor interaction with the retinoblastoma protein potentiates repression of E2F-dependent transcription and cell cycle arrest. *J Biol Chem* 275, 2943-2950.
- Pulsinelli, W. (1992). Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Lancet* 339, 533-536.

Q

- Qin, H., and Powell-Coffman, J.A. (2004). The Caenorhabditis elegans aryl hydrocarbon receptor, AHR-1, regulates neuronal development. *Dev Biol* 270, 64-75.
- Qin, H., Zhai, Z., and Powell-Coffman, J.A. (2006). The Caenorhabditis elegans AHR-1 transcription complex controls expression of soluble guanylate cyclase genes in the URX neurons and regulates aggregation behavior. *Dev Biol* 298, 606-615.

Quinn, T.J., Paolucci, S., Sunnerhagen, K.S., Sivenius, J., Walker, M.F., Toni, D., Lees, K.R., Committee, E.S.O.E.E., and Committee, E.W. (2009). Evidence-based stroke r-e habilitation: an expanded guidance document from the european stroke organisation (ESO) guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. *J Rehabil Med* 41, 99-111.

R

Rannug, U., Rannug, A., Sjöberg, U., Li, H., Westerholm, R., and Bergman, J. (1995). Structure elucidation of two tryptophan-derived, high affinity Ah receptor ligands. *Chem Biol* 2, 841-845.

Raveendran, R., Devi Suma Priya, S., Mayadevi, M., Steephan, M., Santhoshkumar, T.R., Cherian, J., Sanalkumar, R., Pradeep, K.K., James, J., and Omkumar, R.V. (2009).

Phosphorylation status of the NR2B subunit of NMDA receptor regulates its interaction with calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurochem* 110, 92-105.

Raymond, L.A., André, V.M., Cepeda, C., Gladding, C.M., Milnerwood, A.J., and Levine, M.S. (2011). Pathophysiology of Huntington's disease: time-dependent alterations in synaptic and receptor function. *Neuroscience* 198, 252-273.

Reisz-Porszasz, S., Probst, M.R., Fukunaga, B.N., and Hankinson, O. (1994). Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein (ARNT). *Mol Cell Biol* 14, 6075-6086.

Reyes, H., Reisz-Porszasz, S., and Hankinson, O. (1992). Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science* 256, 1193-1195.

Rickhag, M., Teilmann, M., and Wieloch, T. (2007). Rapid and long-term induction of effector immediate early genes (BDNF, Neuritin and Arc) in peri-infarct cortex and dentate gyrus after ischemic injury in rat brain. *Brain research* 1151, 203-210.

Ringelstein, E.B., Chamorro, A., Kaste, M., Langhorne, P., Leys, D., Lyrrer, P., Thijs, V., Thomassen, L., Toni, D., and Committee,

E.S.U.C. (2013). European Stroke Organisation recommendations to establish a stroke unit and stroke center. *Stroke* 44, 828-840.

Robotka, H., Sas, K., Agoston, M., Rózsa, E., Szénási, G., Gigler, G., Vécsei, L., and Toldi, J. (2008). Neuroprotection achieved in the ischaemic rat cortex with L-kynurenine sulphate. *Life Sci* 82, 915-919.

Romera, C., Hurtado, O., Botella, S.H., Lizasoain, I., Cárdenas, A., Fernández-Tomé, P., Leza, J.C., Lorenzo, P., and Moro, M.A. (2004). In vitro ischemic tolerance involves upregulation of glutamate transport partly mediated by the TACE/ADAM17-tumor necrosis factor-alpha pathway. *J Neurosci* 24, 1350-1357.

Rosamond, W., Flegal, K., Friday, G., Furie, K., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Ho, M., Howard, V., Kissela, B., et al. (2007). Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 115, e69-171.

Rose, D.P. (1972). Aspects of tryptophan metabolism in health and disease: a review. *J Clin Pathol* 25, 17-25.

Rothwell, N.J., and Hopkins, S.J. (1995). Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci* 18, 130-136.

Rudinskiy, N., Grishchuk, Y., Vaslin, A., Puyal, J., Delacourte, A., Hirling, H., Clarke, P.G., and Luthi-Carter, R. (2009). Calpain hydrolysis of alpha- and beta2-adaptins decreases clathrin-dependent endocytosis and may promote neurodegeneration. *J Biol Chem* 284, 12447-12458.

S

Safe, S. (1993). Toxicology, structure-function relationship, and human and environmental health impacts of polychlorinated biphenyls: progress and problems. *Environ Health Perspect* 100, 259-268.

Safe, S., Bandiera, S., Sawyer, T., Robertson, L., Safe, L., Parkinson, A., Thomas, P.E., Ryan, D.E., Reik, L.M., and Levin, W. (1985). PCBs: structure-function

- relationships and mechanism of action. *Environ Health Perspect* 60, 47-56.
- Saito, K., Nowak, T.S., Suyama, K., Quearry, B.J., Saito, M., Crowley, J.S., Markey, S.P., and Heyes, M.P. (1993).** Kynurenine pathway enzymes in brain: responses to ischemic brain injury versus systemic immune activation. *J Neurochem* 61, 2061-2070.
- Sala, C., and Sheng, M. (1999).** The fyn art of N-methyl-D-aspartate receptor phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 335-337.
- Salter, M., Hazelwood, R., Pogson, C.I., Iyer, R., and Madge, D.J. (1995).** The effects of a novel and selective inhibitor of tryptophan 2,3-dioxygenase on tryptophan and serotonin metabolism in the rat. *Biochem Pharmacol* 49, 1435-1442.
- Sanchez, Y., Rosado, J.e.D., Vega, L., Elizondo, G., Estrada-Muñiz, E., Saavedra, R., Juárez, I., and Rodríguez-Sosa, M. (2010).** The unexpected role for the aryl hydrocarbon receptor on susceptibility to experimental toxoplasmosis. *J Biomed Biotechnol* 2010, 505694.
- Sanhueza, M., Fernández-Villalobos, G., Stein, I.S., Kasumova, G., Zhang, P., Bayer, K.U., Otmakhov, N., Hell, J.W., and Lisman, J. (2011).** Role of the CaMKII/NMDA receptor complex in the maintenance of synaptic strength. *J Neurosci* 31, 9170-9178.
- Sans, N., Petralia, R.S., Wang, Y.X., Blahos, J., Hell, J.W., and Wenthold, R.J. (2000).** A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *J Neurosci* 20, 1260-1271.
- Sans, N., Prybylowski, K., Petralia, R.S., Chang, K., Wang, Y.X., Racca, C., Vicini, S., and Wenthold, R.J. (2003).** NMDA receptor trafficking through an interaction between PDZ proteins and the exocyst complex. *Nat Cell Biol* 5, 520-530.
- Sans, N., Wang, P.Y., Du, Q., Petralia, R.S., Wang, Y.X., Nakka, S., Blumer, J.B., Macara, I.G., and Wenthold, R.J. (2005).** mPins modulates PSD-95 and SAP102 trafficking and influences NMDA receptor surface expression. *Nat Cell Biol* 7, 1179-1190.
- Sanz-Clemente, A., Nicoll, R.A., and Roche, K.W. (2013).** Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *Neuroscientist* 19, 62-75.
- Sas, K., Robotka, H., Rózsa, E., Agoston, M., Szénási, G., Gigler, G., Marosi, M., Kis, Z., Farkas, T., Vécsei, L., et al. (2008).** Kynurenine diminishes the ischemia-induced histological and electrophysiological deficits in the rat hippocampus. *Neurobiol Dis* 32, 302-308.
- Sattler, R., Charlton, M.P., Hafner, M., and Tymianski, M. (1998).** Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. *J Neurochem* 71, 2349-2364.
- Saver, J.L. (2010).** Targeting the brain: neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. *Pharmacotherapy* 30, 62S-69S.
- Saver, J.L., Smith, E.E., Fonarow, G.C., Reeves, M.J., Zhao, X., Olson, D.M., Schwamm, L.H., and Investigators, G.-S.S.C.a. (2010).** The "golden hour" and acute brain ischemia: presenting features and lytic therapy in >30,000 patients arriving within 60 minutes of stroke onset. *Stroke* 41, 1431-1439.
- Schaldach, C.M., Riby, J., and Bjeldanes, L.F. (1999).** Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. *Biochemistry* 38, 7594-7600.
- Schlüter, O.M., Xu, W., and Malenka, R.C. (2006).** Alternative N-terminal domains of PSD-95 and SAP97 govern activity-dependent regulation of synaptic AMPA receptor function. *Neuron* 51, 99-111.
- Schmidt, J.V., Su, G.H., Reddy, J.K., Simon, M.C., and Bradfield, C.A. (1996).** Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6731-6736.
- Schorge, S., and Colquhoun, D. (2003).** Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *J Neurosci* 23, 1151-1158.
- Schrenk, D. (1998).** Impact of dioxin-type induction of drug-metabolizing enzymes on the metabolism of endo- and xenobiotics. *Biochem Pharmacol* 55, 1155-1162.

- Schwartz, A.L., and Ciechanover, A. (2009).** Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49, 73-96.
- Schwarz, M.J., Guillemin, G.J., Teipel, S.J., Buerger, K., and Hampel, H. (2012).** Increased 3-Hydroxykynurenine serum concentrations differentiate Alzheimer's disease patients from controls. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*.
- Schwetz, B.A., Norris, J.M., Sparschu, G.L., Rowe, U.K., Gehring, P.J., Emerson, J.L., and Gerbig, C.G. (1973).** Toxicology of chlorinated dibenzo-p-dioxins. *Environ Health Perspect* 5, 87-99.
- Seidel, S.D., Winters, G.M., Rogers, W.J., Ziccardi, M.H., Li, V., Keser, B., and Denison, M.S. (2001).** Activation of the Ah receptor signaling pathway by prostaglandins. *J Biochem Mol Toxicol* 15, 187-196.
- Seitz, R.J., Azari, N.P., Knorr, U., Binkofski, F., Herzog, H., and Freund, H.J. (1999).** The role of diaschisis in stroke recovery. *Stroke* 30, 1844-1850.
- Sharp, F.R., and Bernaudin, M. (2004).** HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nat Rev Neurosci* 5, 437-448.
- Shi, L.Z., Faith, N.G., Nakayama, Y., Suresh, M., Steinberg, H., and Czuprynski, C.J. (2007).** The aryl hydrocarbon receptor is required for optimal resistance to *Listeria monocytogenes* infection in mice. *J Immunol* 179, 6952-6962.
- Shichita, T., Ago, T., Kamouchi, M., Kitazono, T., Yoshimura, A., and Ooboshi, H. (2012).** Novel therapeutic strategies targeting innate immune responses and early inflammation after stroke. *J Neurochem* 123 Suppl 2, 29-38.
- Shigeri, Y., Seal, R.P., and Shimamoto, K. (2004).** Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev* 45, 250-265.
- Shimada, T. (2006).** Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet* 21, 257-276.
- Shuttleworth, C.W., and Weiss, J.H. (2011).** Zinc: new clues to diverse roles in brain ischemia. *Trends Pharmacol Sci* 32, 480-486.
- Siesjö, B.K., Agardh, C.D., and Bengtsson, F. (1989).** Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1, 165-211.
- Simon, R.P., Griffiths, T., Evans, M.C., Swan, J.H., and Meldrum, B.S. (1984).** Calcium overload in selectively vulnerable neurons of the hippocampus during and after ischemia: an electron microscopy study in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 4, 350-361.
- Sinal, C.J., and Bend, J.R. (1997).** Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of cyp1a1 by bilirubin in mouse hepatoma hepa 1c1c7 cells. *Mol Pharmacol* 52, 590-599.
- Singh, N., Sharma, G., and Mishra, V. (2012).** Hypoxia inducible factor-1: its potential role in cerebral ischemia. *Cell Mol Neurobiol* 32, 491-507.
- Singh, S.S., Hord, N.G., and Perdew, G.H. (1996).** Characterization of the activated form of the aryl hydrocarbon receptor in the nucleus of HeLa cells in the absence of exogenous ligand. *Arch Biochem Biophys* 329, 47-55.
- Smith, C.M., Chen, Y., Sullivan, M.L., Kochanek, P.M., and Clark, R.S. (2011).** Autophagy in acute brain injury: feast, famine, or folly? *Neurobiol Dis* 43, 52-59.
- Songyang, Z., Fanning, A.S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S.M., Chishti, A.H., Crompton, A., Chan, A.C., Anderson, J.M., and Cantley, L.C. (1997).** Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275, 73-77.
- Spiegel, R., Suchanek, B., Amico, C., Brusa, R., Burnashev, N., Rozov, A., Hvalby, O., Jensen, V., Paulsen, O., Andersen, P., et al. (1998).** Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function in vivo. *Cell* 92, 279-289.
- Stephenson, F.A. (2001).** Subunit characterization of NMDA receptors. *Curr Drug Targets* 2, 233-239.
- Stevens, S.L., Bao, J., Hollis, J., Lessov, N.S., Clark, W.M., and Stenzel-Poore, M.P.**

- (2002). The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res* 932, 110-119.
- Stone, T.W., and Darlington, L.G. (2002).** Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 1, 609-620.
- Stone, T.W., Forrest, C.M., and Darlington, L.G. (2012a).** Kynurenine pathway inhibition as a therapeutic strategy for neuroprotection. *FEBS J* 279, 1386-1397.
- Stone, T.W., Forrest, C.M., Stoy, N., and Darlington, L.G. (2012b).** Involvement of kynurenines in Huntington's disease and stroke-induced brain damage. *J Neural Transm* 119, 261-274.
- Stone, T.W., and Perkins, M.N. (1981).** Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. *Eur J Pharmacol* 72, 411-412.
- Sulejczak, D., Ziemlinska, E., Czarkowska-Bauch, J., Nosecka, E., Strzalkowski, R., and Skup, M. (2007).** Focal photothrombotic lesion of the rat motor cortex increases BDNF levels in motor-sensory cortical areas not accompanied by recovery of forelimb motor skills. *Journal of neurotrauma* 24, 1362-1377.
- Sun, H.S., Jackson, M.F., Martin, L.J., Jansen, K., Teves, L., Cui, H., Kiyonaka, S., Mori, Y., Jones, M., Forder, J.P., et al. (2009).** Suppression of hippocampal TRPM7 protein prevents delayed neuronal death in brain ischemia. *Nat Neurosci* 12, 1300-1307.
- Sutherland, B.A., Minnerup, J., Balami, J.S., Arba, F., Buchan, A.M., and Kleinschnitz, C. (2012).** Neuroprotection for ischaemic stroke: translation from the bench to the bedside. *Int J Stroke* 7, 407-418.
- Swanson, C.J., Bures, M., Johnson, M.P., Linden, A.M., Monn, J.A., and Schoepp, D.D. (2005).** Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nat Rev Drug Discov* 4, 131-144.
- Swanson, H.I., Chan, W.K., and Bradfield, C.A. (1995).** DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J Biol Chem* 270, 26292-26302.
- Symon, L., Lassen, N.A., Astrup, J., and Branston, N.M. (1977).** Thresholds of ischaemia in brain cortex. *Adv Exp Med Biol* 94, 775-782.
- Szydlowska, K., and Tymianski, M. (2010).** Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 47, 122-129.
- Sánchez-Martín, F.J., Fernández-Salguero, P.M., and Merino, J.M. (2010).** 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces apoptosis in neural growth factor (NGF)-differentiated pheochromocytoma PC12 cells. *Neurotoxicology* 31, 267-276.
- Sánchez-Martín, F.J., Fernández-Salguero, P.M., and Merino, J.M. (2011).** Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cerebellar granule cells from mouse. *J Neurochem* 118, 153-162.

T

- Taguchi, A., Hara, A., Saito, K., Hoshi, M., Niwa, M., Seishima, M., and Mori, H. (2008).** Localization and spatiotemporal expression of IDO following transient forebrain ischemia in gerbils. *Brain Res* 1217, 78-85.
- Takagi, N., Logan, R., Teves, L., Wallace, M.C., and Gurd, J.W. (2000).** Altered interaction between PSD-95 and the NMDA receptor following transient global ischemia. *J Neurochem* 74, 169-178.
- Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J.D., and Herman, B. (1999).** Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev* 79, 1089-1125.
- Takikawa, O., Habara-Ohkubo, A., and Yoshida, R. (1990).** IFN-gamma is the inducer of indoleamine 2,3-dioxygenase in allografted tumor cells undergoing rejection. *J Immunol* 145, 1246-1250.
- Tanida, T., Tasaka, K., Akahoshi, E., Ishihara-Sugano, M., Saito, M., Kawata, S., Danjo, M., Tokumoto, J., Mantani, Y., Nagahara, D., et al. (2013).** Fetal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin transactivates aryl hydrocarbon receptor-responsive element III in the tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons of the mouse midbrain. *J Appl Toxicol*.
- Tarpey, P., Parnau, J., Blow, M., Woffendin, H., Bignell, G., Cox, C., Cox, J., Davies, H., Edkins, S., Holden, S., et al.**

- (2004). Mutations in the DLG3 gene cause nonsyndromic X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 75, 318-324.
- Taylor, B.L., and Zhulin, I.B. (1999).** PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 479-506.
- Terasaki, Y., Sasaki, T., Yagita, Y., Okazaki, S., Sugiyama, Y., Oyama, N., Omura-Matsuoka, E., Sakoda, S., and Kitagawa, K. (2010).** Activation of NR2A receptors induces ischemic tolerance through CREB signaling. *J Cereb Blood Flow Metab* 30, 1441-1449.
- Thackaberry, E.A., Gabaldon, D.M., Walker, M.K., and Smith, S.M. (2002).** Aryl hydrocarbon receptor null mice develop cardiac hypertrophy and increased hypoxia-inducible factor-1alpha in the absence of cardiac hypoxia. *Cardiovasc Toxicol* 2, 263-274.
- Thackray, S.J., Mowat, C.G., and Chapman, S.K. (2008).** Exploring the mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochem Soc Trans* 36, 1120-1123.
- Thoenen, H., Barde, Y.A., Davies, A.M., and Johnson, J.E. (1987).** Neurotrophic factors and neuronal death. *Ciba Found Symp* 126, 82-95.
- Thomas, C.G., Miller, A.J., and Westbrook, G.L. (2006).** Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 95, 1727-1734.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., and Dingledine, R. (2010).** Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62, 405-496.
- Tu, W., Xu, X., Peng, L., Zhong, X., Zhang, W., Soundarapandian, M.M., Balel, C., Wang, M., Jia, N., Lew, F., et al. (2010).** DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke. *Cell* 140, 222-234.
- Turner, R.C., Dodson, S.C., Rosen, C.L., and Huber, J.D. (2013).** The science of cerebral ischemia and the quest for neuroprotection: navigating past failure to future success. *J Neurosurg*.
- Tymianski, M. (1996).** Cytosolic calcium concentrations and cell death in vitro. *Adv Neurol* 71, 85-105.
- Tymianski, M., and Tator, C.H. (1996).** Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. *Neurosurgery* 38, 1176-1195.
- ## V
- Van Campenhout, C.A., Eitelhuber, A., Gloeckner, C.J., Giallonardo, P., Gegg, M., Oller, H., Grant, S.G., Krappmann, D., Ueffing, M., and Lickert, H. (2011).** Dlg3 trafficking and apical tight junction formation is regulated by nedd4 and nedd4-2 e3 ubiquitin ligases. *Dev Cell* 21, 479-491.
- Vanden Heuvel, J.P., and Lucier, G. (1993).** Environmental toxicology of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. *Environ Health Perspect* 100, 189-200.
- Vicini, S., Wang, J.F., Li, J.H., Zhu, W.J., Wang, Y.H., Luo, J.H., Wolfe, B.B., and Grayson, D.R. (1998).** Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neurophysiol* 79, 555-566.
- Vikström Bergander, L., Cai, W., Klocke, B., Seifert, M., and Pongratz, I. (2012).** Tryptamine serves as a proligand of the AhR transcriptional pathway whose activation is dependent of monoamine oxidases. *Mol Endocrinol* 26, 1542-1551.
- Vila, N., Castillo, J., Dávalos, A., and Chamorro, A. (2000).** Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke* 31, 2325-2329.
- Vila, N., and Chamorro, A. (1995).** Cytokines and acute-phase response in acute stroke. *Stroke* 26, 1729.
- Vizi, E.S., Kisfali, M., and Lőrincz, T. (2013).** Role of nonsynaptic GluN2B-containing NMDA receptors in excitotoxicity: Evidence that fluoxetine selectively inhibits these receptors and may have neuroprotective effects. *Brain Res Bull* 93, 32-38.
- Vogel, C.F., Li, W., Wu, D., Miller, J.K., Sweeney, C., Lazennec, G., Fujisawa, Y., and Matsumura, F. (2011).** Interaction of aryl hydrocarbon receptor and NF-κB

subunit RelB in breast cancer is associated with interleukin-8 overexpression. *Arch Biochem Biophys* 512, 78-86.

Vogel, C.F., Sciallo, E., Li, W., Wong, P., Lazennec, G., and Matsumura, F. (2007a). RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol* 21, 2941-2955.

Vogel, C.F., Sciallo, E., and Matsumura, F. (2007b). Involvement of RelB in aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of chemokines. *Biochem Biophys Res Commun* 363, 722-726.

Vécsei, L., Szalárdy, L., Fülöp, F., and Toldi, J. (2013). Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nat Rev Drug Discov* 12, 64-82.

W

Walker, M.K., Heid, S.E., Smith, S.M., and Swanson, H.I. (2000). Molecular characterization and developmental expression of the aryl hydrocarbon receptor from the chick embryo. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 126, 305-319.

Wang, Q., Tang, X.N., and Yenari, M.A. (2007). The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 184, 53-68.

Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K., and Mishina, M. (1993). Distinct distributions of five N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit mRNAs in the forebrain. *J Comp Neurol* 338, 377-390.

Watson, A.J., and Hankinson, O. (1992). Dioxin- and Ah receptor-dependent protein binding to xenobiotic responsive elements and G-rich DNA studied by in vivo footprinting. *J Biol Chem* 267, 6874-6878.

Williams, K., Russell, S.L., Shen, Y.M., and Molinoff, P.B. (1993). Developmental switch in the expression of NMDA receptors occurs in vivo and in vitro. *Neuron* 10, 267-278.

Williamson, M.A., Gasiewicz, T.A., and Opanashuk, L.A. (2005). Aryl hydrocarbon receptor expression and activity in cerebellar granule neuroblasts: implications for development and dioxin neurotoxicity. *Toxicol Sci* 83, 340-348.

Wilson, C.L., and Safe, S. (1998). Mechanisms of ligand-induced aryl hydrocarbon receptor-mediated

biochemical and toxic responses. *Toxicol Pathol* 26, 657-671.

Wilson, S.M., Bhattacharyya, B., Rachel, R.A., Coppola, V., Tessarollo, L., Householder, D.B., Fletcher, C.F., Miller, R.J., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (2002). Synaptic defects in ataxia mice result from a mutation in Usp14, encoding a ubiquitin-specific protease. *Nat Genet* 32, 420-425.

Wong, P.W., Joy, R.M., Albertson, T.E., Schantz, S.L., and Pessah, I.N. (1997). Ortho-substituted 2,2',3,5',6-pentachlorobiphenyl (PCB 95) alters rat hippocampal ryanodine receptors and neuroplasticity in vitro: evidence for altered hippocampal function. *Neurotoxicology* 18, 443-456.

Wroge, C.M., Hogins, J., Eisenman, L., and Mennerick, S. (2012). Synaptic NMDA receptors mediate hypoxic excitotoxic death. *J Neurosci* 32, 6732-6742.

X

Xiong, Z.G., Zhu, X.M., Chu, X.P., Minami, M., Hey, J., Wei, W.L., MacDonald, J.F., Wemmie, J.A., Price, M.P., Welsh, M.J., et al. (2004). Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels. *Cell* 118, 687-698.

Xu, J., Kurup, P., Zhang, Y., Goebel-Goody, S.M., Wu, P.H., Hawasli, A.H., Baum, M.L., Bibb, J.A., and Lombroso, P.J. (2009). Extrasynaptic NMDA receptors couple preferentially to excitotoxicity via calpain-mediated cleavage of STEP. *J Neurosci* 29, 9330-9343.

Y

Yuen, E.Y., Ren, Y., and Yan, Z. (2008). Postsynaptic density-95 (PSD-95) and calcineurin control the sensitivity of N-methyl-D-aspartate receptors to calpain cleavage in cortical neurons. *Mol Pharmacol* 74, 360-370.

Z

Zanni, G., van Esch, H., Bensalem, A., Saillour, Y., Poirier, K., Castelnau, L., Ropers, H.H., de Brouwer, A.P., Laumonnier, F., Fryns, J.P., et al. (2010). A novel mutation in the DLG3 gene encoding the synapse-associated protein 102

- (SAP102) causes non-syndromic mental retardation. *Neurogenetics* 11, 251-255.
- Zemke, D., Smith, J.L., Reeves, M.J., and Majid, A. (2004).** Ischemia and ischemic tolerance in the brain: an overview. *Neurotoxicology* 25, 895-904.
- Zhang, F., Guo, A., Liu, C., Comb, M., and Hu, B. (2013a).** Phosphorylation and assembly of glutamate receptors after brain ischemia. *Stroke* 44, 170-176.
- Zhang, F., Liu, C.L., and Hu, B.R. (2006).** Irreversible aggregation of protein synthesis machinery after focal brain ischemia. *J Neurochem* 98, 102-112.
- Zhang, J.H., Badaut, J., Tang, J., Obenaus, A., Hartman, R., and Pearce, W.J. (2012).** The vascular neural network--a new paradigm in stroke pathophysiology. *Nat Rev Neurol* 8, 711-716.
- Zhang, K., Li, Y.J., Yang, Q., Gerile, O., Yang, L., Li, X.B., Guo, Y.Y., Zhang, N., Feng, B., Liu, S.B., et al. (2013b).** Neuroprotective effects of oxymatrine against excitotoxicity partially through down-regulation of NR2B-containing NMDA receptors. *Phytomedicine* 20, 343-350.
- Zhang, L., Savas, U., Alexander, D.L., and Jefcoate, C.R. (1998).** Characterization of the mouse Cyp1B1 gene. Identification of an enhancer region that directs aryl hydrocarbon receptor-mediated constitutive and induced expression. *J Biol Chem* 273, 5174-5183.
- Zhang, N., Agbor, L.N., Scott, J.A., Zalobowski, T., Elased, K.M., Trujillo, A., Duke, M.S., Wolf, V., Walsh, M.T., Born, J.L., et al. (2010a).** An activated renin-angiotensin system maintains normal blood pressure in aryl hydrocarbon receptor heterozygous mice but not in null mice. *Biochem Pharmacol* 80, 197-204.
- Zhang, S., Edelmann, L., Liu, J., Crandall, J.E., and Morabito, M.A. (2008).** Cdk5 regulates the phosphorylation of tyrosine 1472 NR2B and the surface expression of NMDA receptors. *J Neurosci* 28, 415-424.
- Zhang, S., Qin, C., and Safe, S.H. (2003).** Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. *Environ Health Perspect* 111, 1877-1882.
- Zhang, S.J., Steijaert, M.N., Lau, D., Schütz, G., Delucinge-Vivier, C., Descombes, P., and Bading, H. (2007).** Decoding NMDA receptor signaling: identification of genomic programs specifying neuronal survival and death. *Neuron* 53, 549-562.
- Zhang, S.J., Zou, M., Lu, L., Lau, D., Ditzel, D.A., Delucinge-Vivier, C., Aso, Y., Descombes, P., and Bading, H. (2009).** Nuclear calcium signaling controls expression of a large gene pool: identification of a gene program for acquired neuroprotection induced by synaptic activity. *PLoS Genet* 5, e1000604.
- Zhang, Y., Su, P., Liang, P., Liu, T., Liu, X., Liu, X.Y., Zhang, B., Han, T., Zhu, Y.B., Yin, D.M., et al. (2010b).** The DREAM protein negatively regulates the NMDA receptor through interaction with the NR1 subunit. *J Neurosci* 30, 7575-7586.
- Zhao, B., Degroot, D.E., Hayashi, A., He, G., and Denison, M.S. (2010).** CH223191 is a ligand-selective antagonist of the Ah (Dioxin) receptor. *Toxicol Sci* 117, 393-403.
- Zhao, L.R., Mattsson, B., and Johansson, B.B. (2000).** Environmental influence on brain-derived neurotrophic factor messenger RNA expression after middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience* 97, 177-184.
- Zhao, X., MacBride, M.M., Peterson, B.R., Pfaff, D.W., and Vasudevan, N. (2005).** Calcium flux in neuroblastoma cells is a coupling mechanism between non-genomic and genomic modes of estrogens. *Neuroendocrinology* 81, 174-182.
- Zheng, C.Y., Petralia, R.S., Wang, Y.X., Kachar, B., and Wenthold, R.J. (2010).** SAP102 is a highly mobile MAGUK in spines. *J Neurosci* 30, 4757-4766.
- Zhou, L., Li, F., Xu, H.B., Luo, C.X., Wu, H.Y., Zhu, M.M., Lu, W., Ji, X., Zhou, Q.G., and Zhu, D.Y. (2010).** Treatment of cerebral ischemia by disrupting ischemia-induced interaction of nNOS with PSD-95. *Nat Med* 16, 1439-1443.
- Zinger, A., Barcia, C., Herrero, M.T., and Guillemin, G.J. (2011).** The involvement of neuroinflammation and kynurenine pathway in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis* 2011, 716859.

